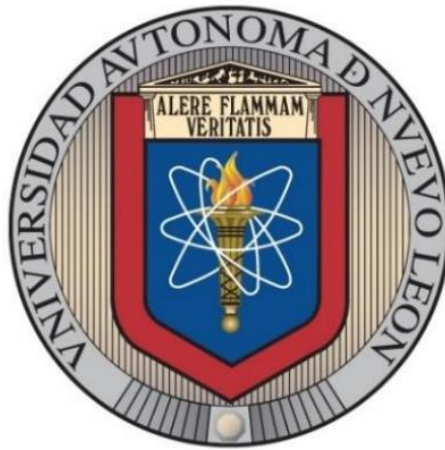


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



TESIS

**EFFECTO DE LA MORFOLOGÍA DE LAS NANOESTRUCTURAS
FORMADAS POR MEDIO DE ANODIZADO EN UNA ALEACIÓN
SUPERELÁSTICA BASE Ti SOBRE SUS PROPIEDADES
BIOCOMPATIBLES *IN VITRO***

POR

Q.B.P. FRANK EDUARDO MELÉNDEZ ANZURES

**EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA**

JULIO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**EFFECTO DE LA MORFOLOGÍA DE LAS NANOESTRUCTURAS
FORMADAS POR MEDIO DE ANODIZADO EN UNA ALEACIÓN
SUPERELÁSTICA BASE Ti SOBRE SUS PROPIEDADES
BIOCOMPATIBLES *IN VITRO***

POR

Q.B.P. FRANK EDUARDO MELÉNDEZ ANZURES

**EN OPCIÓN AL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JULIO DE 2017

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y ELECTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis "Efecto de la morfología de las nanoestructuras formadas por medio de anodizado en una aleación superelástica base Ti sobre sus propiedades biocompatibles *in vitro*" realizada por el alumno Frank Eduardo Meléndez Anzures, con número de matrícula 1413954, sea aceptada para su defensa como opción al grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Nanotecnología

El Comité de Tesis



Dr. Luis Alberto López Pavón
Director

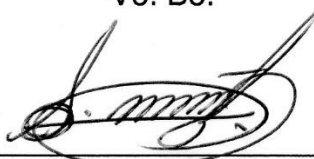


Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez
Revisor



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Revisor

Vo. Bo.



Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Julio de 2017

DEDICATORIAS

Este proyecto de tesis está dedicado con mucho amor a:

A mis padres

Rocío Anzures Ayón y Francisco Antonio Meléndez González

por todo el amor, apoyo, comprensión y sacrificio incondicional

A mi hermano

Anttoney Erick Meléndez Anzures

por su apoyo y los gratos momentos que hemos vivido juntos

Gracias por estar siempre junto a mí

Dios los bendiga

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Alberto López Pavón**, por el apoyo que me ha otorgado durante el desarrollo de esta tesis y su compromiso como director del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez**, por el apoyo profesional que siempre me ha brindado y por haber aceptado formar parte de la comisión de esta tesis.

A la **Dra. Diana Ginette Zárate Triviño**, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, le externo mi más sincero agradecimiento por haber aceptado participar en la comisión de esta tesis, gracias por brindarme su amable amistad.

Al **cDr. Juan José Martínez Sanmiguel** y **CD. Perla Raquel Ramos** por su valiosa colaboración y por el apoyo brindado durante las diferentes etapas del desarrollo de esta investigación.

A mis Compañeros del Laboratorio de Depositación: **cDr. Sarai Villalpando Hernández** y **cDr. Daniel Dagnino Acosta**, con quienes compartí una de las etapas más importantes en mi formación profesional.

A mis Compañeros del **L-18** del Departamento de Inmunología y Virología, gracias por todo su apoyo.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** y a la **Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica**, por abrirme las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el financiamiento de la beca brindada a mi persona durante el periodo de realización de esta maestría.

ÍNDICE

Sección	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Hipótesis	5
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo General	5
1.2.2 Objetivos particulares	6
1.3 Referencias	7
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	9
2.1 Biomateriales	9
2.2 Materiales con memoria de forma y superelasticidad	10
2.3 Funcionalización superficial mediante la técnica de anodizado	11
2.4 Pruebas de biocompatibilidad	13
2.5 Liberación de fármaco a partir de aleaciones anodizadas	14
2.6 Referencias	17
3. METODOLOGÍA	26
3.1 Aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn	27
3.2 Tratamientos térmicos	27
3.3 Funcionalización por anodizado y caracterización de la superficie con las nanoestructuras	27
3.4 Cultivo primario de osteoblastos	29
3.4.1 Caracterización de osteoblastos	30
3.5 Pruebas de biocompatibilidad “ <i>in vitro</i> ”	31
3.5.1 Cultivo celular	31
3.5.2 Preparación de las aleaciones	32

3.5.3	Ensayo de citotoxicidad por MTT	32
3.5.4	Pruebas de adhesión celular por Microscopía de Fluorescencia ..	33
3.6	Pruebas antibacterianas contra <i>S. aureus</i>	35
3.6.1	Pruebas de liberación de fármaco	35
3.6.2	Activación del microorganismo.....	36
3.6.3	Método del antibiograma.....	36
3.6.4	Método de espectrofotometría	37
3.6.5	Método de vertido en placa	38
3.7	Diseño y fabricación de la placa mandibular a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	38
3.8	Fijación biológica de la placa mandibular y desarrollo de pruebas “ <i>in vivo</i> ”	40
3.9	Referencias.....	41
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
4.1	Introducción	42
4.2	Análisis de las curvas de densidad de corriente-tiempo que indica el crecimiento de las capas anódicas en la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	43
4.3	Caracterización de la morfología y composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, mediante Microscopía Electrónica de Barrido	47
4.4	Estudio de la adhesión de las células de cultivo primario a las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn mediante microscopía de fluorescencia	57
4.5	Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT.....	61
4.6	Estudio de la liberación “ <i>in vitro</i> ” del fármaco gentamicina a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	66
4.7	Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre <i>S. aureus</i> por el método del antibiograma	70
4.8	Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre <i>S. aureus</i> por el método de Espectrofotometría	74

4.9	Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre <i>S. aureus</i> por el método de vertido en placa	78
4.10	Estudio “ <i>in vivo</i> ” de la regeneración del tejido óseo mediante la implantación quirúrgica de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada con nanoestructuras de óxido de titanio	81
4.11	Referencias.....	86
5.	CONCLUSIONES	93

RESUMEN

En la última década, el desarrollo de materiales biocompatibles ha entrado en la era de la nanotecnología. La interfaz entre los materiales biocompatibles y la nanotecnología ha creado enormes oportunidades para mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. El éxito de un material biocompatible está intrínsecamente ligado con el mejoramiento de sus propiedades. Las aleaciones con memoria de forma, poseen la propiedad mecánica de recordar una forma previamente establecida aún después de someter la estructura a deformaciones severas. Ocurre mediante un simple calentamiento, efecto de memoria de forma o con simplemente retirar la carga, efecto superelástico. Esto ocurre debido a un cambio en la estructura cristalina del material en dos diferentes fases: la Austenita (alta temperatura) y la Martensita, (baja temperatura). Estas propiedades sumadas a su bajo costo relativo, su facilidad de manufactura y su biocompatibilidad, hacen de estas aleaciones un interesante objeto de estudio para su aplicación en el área de biomedicina. Las aleaciones equiatómicas de TiNi, debido a sus superiores propiedades mecánicas han sido hasta el momento las más utilizadas, sin embargo, existe la preocupación por el Ni, el cuál causa hipersensibilidad y es cancerígeno. Por ello, nuevas aleaciones de titanio de alta resistencia compuestas de elementos no tóxicos se requieren en aplicaciones médicas. Es en este sentido en el que se justifica el trabajo que aquí se propone, pues se estudia una aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn con propiedades de memoria de superelasticidad con el fin de ser utilizada como prótesis. La superficie de este tipo de aleaciones forma de manera natural una capa de óxido Ti del orden de 2-10 nm, esta capa de óxido eleva la biocompatibilidad de la aleación, además de mejorar la oseointegración. Uno de los problemas principales es el tiempo en el que se forma esta capa de óxido, en este trabajo se empleó la técnica de anodizado para generar nanoestructuras de óxido de titanio que le confieren a la superficie una funcionalidad distinta a la del resto del material.

Se estudió la biocompatibilidad de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada por la técnica de anodizado mediante pruebas de experimentación "*in vitro*" empleando cultivos celulares, con lo que se determinó la citotoxicidad de la aleación. El éxito de los biomateriales no solo depende de la oseointegración, sino también de la presencia de un entorno estéril alrededor del material. Uno de los principales problemas asociados a las placas metálicas son las infecciones post-operatorias que pueden llegar a provocar el rechazo del material. Una forma de prevenir estas infecciones es modificar la superficie del material para proveerla con propiedades antibacterianas. Por tal motivo, se estudió la liberación "*in vitro*" del fármaco gentamicina a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y se determinaron las propiedades antibacterianas de la aleación funcionalizada mediante pruebas microbiológicas "*in vitro*" contra *S. aureus*. Para concluir, se evaluó "*in vivo*" el comportamiento de la aleación funcionalizada con nanoestructuras, a partir de la implantación quirúrgica de la aleación en la mandíbula de ratas con lo cual se estudió la evolución y la regeneración del tejido óseo.

1. INTRODUCCIÓN

Biomateriales, es un término utilizado para los materiales, sustancias o combinación de éstos, de origen natural o sintético, que pueden ser utilizados como un todo o como parte de un sistema que trata, aumenta, o sustituye cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [1], y que no deben de provocar reacciones adversas en los tejidos con los que se encuentren en contacto. En 1987 la Sociedad Europea de Biomateriales definió el término de biocompatibilidad como la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica [2]. Por su parte, la nanotecnología ha permitido estudiar, diseñar, crear, sintetizar, manipular y aplicar materiales biocompatibles, que funcionan a través del control de la materia a nanoescala (1-100 nm) [3]. La aplicación de biomateriales metálicos en el ámbito de los implantes biomédicos es un éxito indiscutible en un gran número de aplicaciones. Uno de los metales más utilizados para estos fines es el Titanio. La biocompatibilidad del Ti se debe en gran parte a la formación natural de una película nanométrica de óxido de Ti, lo que facilita la interacción con el medio biológico [4, 5]. Sin embargo, es largo el tiempo que se necesita para que se produzca esta película nanométrica. Este hecho ha originado que el crecimiento de películas de TiO_2 de manera controlada sea uno de los campos de investigación que mayor atención ha recibido en los últimos años [6]. Se ha reportado que el crecimiento de los nanotubos de óxido de titanio sobre implantes de titanio es una ruta prometedora para la mejora de la biocompatibilidad y la oseointegración [7-9]. El anodizado, es una de las técnicas más versátiles y económicas para funcionalizar las superficies de titanio y es el proceso empleado en el presente trabajo de investigación. Los antecedentes y el marco teórico relacionados a la técnica de anodización se presentan en el capítulo 2.

En el capítulo 3, se describe la metodología experimental seguida en esta investigación. Se dan a conocer los reactivos y materiales empleados en la técnica de anodización, así como las condiciones en las que se llevó a cabo, además se mencionan los equipos empleados para la etapa de caracterización y composición elemental de las nanoestructuras obtenidas. Más adelante en este mismo capítulo, se detalla la metodología de las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*” para las aleaciones anodizadas, se indica el tipo de células empleadas, para los ensayos de citotoxicidad y adhesión celular, así como las condiciones de cultivo, igualmente se dan a conocer los reactivos, materiales y equipos empleados para el desarrollo de estas pruebas. Como parte del mejoramiento de la biocompatibilidad, se describe la metodología de las pruebas antibacterianas, se explica cómo se prepararon las aleaciones en el ensayo de liberación del fármaco, posteriormente, se indica el microorganismo empleado y las condiciones en las que es cultivado para el desarrollo de las pruebas de antibiograma, espectrofotometría y recuento en placa.

Para concluir el capítulo se redacta la metodología para las pruebas de biocompatibilidad “*in vivo*”, se mencionan las características principales que debe poseer el modelo animal de experimentación, además de las especificaciones para la implantación quirúrgica del material.

En el capítulo 4, se presentan los resultados de los experimentos realizados en esta investigación, se analizan las curvas de corriente contra el tiempo obtenidas mediante el proceso de anodización, a continuación, se presentan y discuten los resultados de la etapa de caracterización de la morfología y composición elemental de las nanoestructuras crecidas sobre la superficie de la aleación. Posteriormente, se muestran los resultados de las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”, se describen y discuten los resultados del estudio de la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones anodizadas y de la evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas sobre las células óseas de cultivo primario. Más adelante en este capítulo se redactan los resultados del proceso de liberación del fármaco en las aleaciones anodizadas, así como la

determinación de las propiedades antibacterianas por las técnicas microbiológicas del antibiograma, la técnica de espectrofotometría y el recuento bacteriano en placa. Para finalizar el capítulo, se muestran los resultados de las pruebas de biocompatibilidad “*in vivo*”, se describe la implantación quirúrgica de la aleación y se discute la evolución y regeneración del tejido óseo, que es uno de los principales intereses de esta investigación.

El análisis y discusión de los resultados nos lleva al capítulo 5, el de conclusiones. Aquí se redactan los argumentos y afirmaciones de los datos experimentales y constituye la parte final de la presente investigación.

1.1 Hipótesis

Mediante las condiciones de anodizado es posible controlar la morfología de las nanoestructuras de óxido sobre la superficie, haciendo posible encontrar la condición óptima que mejore las propiedades biomédicas de la aleación.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Funcionalizar la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn con nanoestructuras de óxido mediante la técnica de anodizado y evaluar la respuesta mediante técnicas “*in vitro*” y en los tejidos vivos en presencia de la aleación utilizada como placa mandibular en animales de experimentación.

1.2.2 Objetivos particulares

1. Realizar los tratamientos térmicos en la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn para la obtención de las propiedades mecánicas de superelasticidad.
2. Funcionalizar la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn mediante la técnica de anodización para la obtención de nanoestructuras óxido de Ti.
3. Caracterizar la morfología de nanoestructuras de óxido de Ti en la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada por las técnicas de SEM y EDAX.
4. Estudiar la biocompatibilidad de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada por la técnica de anodizado mediante pruebas de experimentación "*in vitro*" usando cultivos celulares mediante las cuales se determinará la citotoxicidad de la aleación.
5. Estudiar la liberación "*in vitro*" del fármaco gentamicina a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.
6. Determinar las propiedades antibacterianas de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada por la técnica de anodizado mediante pruebas microbiológicas "*in vitro*" contra *S. aureus*.
7. Diseñar una placa mandibular cuya configuración permita su fácil adaptación a los requerimientos funcionales y condiciones físicas de los animales de experimentación.
8. Fabricar una placa mandibular biocompatible a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn cuyas características funcionales permitan la integración y unión al hueso en animales de experimentación.

9. Implantar quirúrgicamente la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada por la técnica de anodizado y realizar las pruebas de biocompatibilidad “*in vivo*” en animales de experimentación que permitan evaluar la respuesta de los tejidos vivos en presencia de la aleación.

1.3 Referencias

1. Joon Park, R. S. Lakes. (2007). Biomaterials: An Introduction. Iowa, USA: Springer Science & Business Media ISBN 978-0-387-37879-4.
2. Mjör IA. Problems and benefits associated with restorative materials: side effects and long-term cost. Adv Dent Res 1992; 6: 7-16.
3. Whitesides GM. The “right” size in nanobiotechnology. NatBiotechnol. 2003; 21:1161-5.
4. Wei W, Berger S, Hauser C, Meyer K, Yang M, Schmuki P. Transition of TiO₂ nanotubes to nanopores for electrolytes with very low water contents. Electrochem. Commun. 2010; 12: 1184–1186.
5. Rohani S, Ruby A. Synthesis of Titania Nanotube Arrays by Anodization. AIDIC Conference series 2009; 9: 121–129.
6. J. Park, S. Bauer, K. Von Der Mark, P. Schmuki, Nano Lett. 7 (2007) 1686.
7. X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface nano-functionalization of biomaterials, Materials Science and Engineering: R: Reports, 70 (2010) 275-302.

8. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 23, Issue 4, 10 June 2003, Pages 551-560, ISSN 0928-4931.
9. X.J. Feng, J.M. Macak, S.P. Albu, P. Schmuki, Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti–28Zr–8Nb biomedical alloy surface, *Acta Biomaterialia*, Volume 4, Issue 2, March 2008, Pages 318-323, ISSN 1742-7061.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 Biomateriales

Un biomaterial se puede definir como un material no biológico utilizado como dispositivo médico, destinado a interactuar con sistemas biológicos, para reemplazar extremidades, tejidos u órganos, o bien para aumentar su funcionalidad [1, 2]. Dentro de la definición de los biomateriales están incluidos los materiales metálicos [3].

Las principales características que deben cumplir los biomateriales metálicos es que sean biofuncionales, es decir, que el material cumpla con las funciones para las que fue diseñado exhibiendo buenas propiedades físicas y mecánicas, que sean biocompatibles, lo cual hace referencia a que no presenten reacciones fisicoquímicas nocivas entre el material y el entorno biológico, que tengan una alta resistencia a la corrosión y al desgaste, por lo cual no deben liberar iones o partículas metálicas al interactuar con los fluidos corporales y por último que favorezcan la oseointegración, para que la superficie del implante establezca una conexión directa, estructural y funcional con el hueso vivo adyacente [3-5].

Uno de los metales más utilizados como implantes biomédicos es el Titanio y sus aleaciones. Esto se debe, entre otras cosas, a su alta resistencia a la corrosión, su buena biocompatibilidad, su baja densidad, el valor del módulo de elasticidad más cercano al del hueso en comparación con otros materiales metálicos como aceros inoxidables o aleaciones de Co-Cr y la capacidad de formar naturalmente una película nanométrica de óxido de Ti [3].

El éxito de un biomaterial está intrínsecamente ligado con el mejoramiento de sus propiedades. Una de las principales características que poseen los materiales empleados como implantes biomédicos, son las propiedades de memoria de forma y superelasticidad.

2.2 Materiales con memoria de forma y superelasticidad

El efecto de memoria de forma (SME, por sus siglas en inglés) puede ser descrito como la capacidad de una aleación de ser deformada a partir de su forma original con una gran cantidad de deformación sin que ésta sea permanente. La forma original de la aleación es recuperada si la aleación se calienta hasta alcanzar una temperatura determinada que depende de la aleación. El efecto superelástico (SE) se describe como la capacidad de una aleación de acomodar una gran cantidad de deformación cuando una carga es aplicada y recuperar su forma cuando la carga es removida a temperaturas relativamente altas [6, 7].

Las aleaciones con memoria de forma (SMA, por sus siglas en inglés) son aleaciones especiales que exhiben el efecto de memoria de forma y superelástico dependiendo de la temperatura a la cual se aplique la carga. Se han desarrollado diferentes SMA, siendo las aleaciones de TiNi las más usadas debido a sus propiedades, seguidas de las de base Cu, tales como: CuZnAl, CuAlNi, CuAlBe, CuZn [8, 9].

El efecto superelástico es además aplicado en lentes, audífonos y alambres de ortodoncia para corregir los dientes [10]. Para el caso de las aplicaciones biomédicas (implantes, grapas ortopédicas, stents entre otras), dos demandas necesitan ser satisfechas; biofuncionalidad y biocompatibilidad. Las aleaciones más utilizadas a la fecha han sido las bases Ti-Ni, puesto que se consideran superiores a otras aleaciones en lo referente a efecto superelástico y al de memoria de forma, además de su biocompatibilidad [11, 12].

Sin embargo, algunos reportes han señalado alergia e hipersensibilidad en el cuerpo debido al Níquel [13-15]. Por esta razón, recientemente, se ha venido desarrollando investigaciones para producir aleaciones base-Ti libres de Ni con memoria de forma, sustituyendo el Ni por elementos que tengan una completa biocompatibilidad, como es el caso del Nb el cual ha demostrado no solo no ser cancerígeno sino además hipoalergénico [16-19]. Además, ha sido utilizado en algunos aparatos médicos como los marcapasos [20]. Otro problema en el campo biomédico es la compatibilidad del hueso y el implante, por eso las aleaciones utilizadas para este propósito tienen que tener un módulo elástico muy cercano

al hueso para poder promover la regeneración del hueso y evitar el proceso de resorción. Así, debido también al bajo módulo en la fase austenita del Ti, se ha trabajado con este material y otros elementos aleantes, tales como Nb, Zr y Hf. Conociendo todo lo anterior, se sigue investigando diferentes sistemas de aleaciones y las más prometedoras que exhiben el efecto de memoria de forma y/o el efecto superelástico son: 1) Ti-Mo y 2) Ti-Nb [21-23]. Recientemente ha sido elaborada y caracterizada mecánicamente la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn para posibles aplicaciones biomédicas [24].

Esta aleación demostró un efecto superelástico superior a las aleaciones de Ti libres de Ni con memoria de forma, por lo que es necesario una investigación sistemática sobre sus efectos directos sobre medios biológicos.

2.3 Funcionalización superficial mediante la técnica de anodizado

Las aleaciones utilizadas en medios biológicos se funcionalizan para una mejor interacción con el medio [25]. Las aleaciones de Ti forman de manera natural una película delgada de óxido de Ti, la funcionalización ayuda crear diferentes morfologías de nanoestructuras de óxido de titanio [26]. La anodización es un proceso electroquímico empleado en los últimos años para producir estructuras controladas a nanoescala. La modificación de la superficie es llevada a cabo en una celda electroquímica, en la cual se aplica una diferencia de potencial entre electrodos [27]. Los materiales a oxidar actúan como electrodo positivo o ánodo, mientras que como electrodo negativo o cátodo se emplean materiales químicamente inertes en el baño de anodizado como el platino [28]. Ambos electrodos se conectan a un circuito eléctrico externo para establecer una diferencia de voltaje o corriente entre ellos. La elección cátodo influye en la velocidad del crecimiento de las capas anódicas afectando directamente en la sobretensión producida entre el cátodo y el ánodo, lo que puede originar cambios en la morfología y espesor de la capa de óxido [29]. En el caso del titanio y sus aleaciones, se ha reportado que el crecimiento de capas se genera mediante el

empleo de electrolitos acuosos que contengan iones fluoruros o cloruros, debido a la solubilidad del óxido de titanio, en presencia de estas soluciones, lo que afecta directamente a las características morfológicas de los nanotubos generados [30, 31].

Como ya se mencionó, las capas de nanotubos de TiO_2 se forman por una reacción de oxidación electroquímica que, dependiendo del electrolito, el voltaje aplicado, el material a anodizar y el tiempo de anodizado, se ha reportado que existen tres posibles reacciones.

1.- Los iones metálicos se disuelven en el electrolito, esto quiero decir que el metal se disuelve de forma continua generando la corrosión o electropulido del metal.

2.- Los iones formados reaccionan con el oxígeno, proporcionados por el agua presente en el electrolito, lo que da lugar a la formación de un óxido compacto que no es soluble en el electrolito.

3.- Se establece la competencia entre la formación de óxido y la disolución química que conduce a la formación de poros [32]. Estos poros crecen generando estructuras nanotubulares, por efecto de la disolución asistida por el campo eléctrico aplicado y la disolución química, generando un equilibrio entre la formación del óxido en la intercara metal/óxido y disolución química en la interfase óxido/electrolito [33].

Se ha reportado, que el proceso para la formación de estructuras nanotubulares se lleva a cabo mediante la aplicación de un barrido de potencial a una tensión constante entre 1-30 V en electrolito acuoso [34].

Recientemente se ha reportado que la fabricación de nanotubos de TiO_2 a partir de aleaciones que contenían los elementos Nb y Zr, presentan excelentes propiedades biológicas [35-37]. El crecimiento de los nanotubos de óxido de titanio sobre implantes de titanio es una ruta prometedora para la mejora de la biocompatibilidad y la oseointegración [38, 39].

Para el uso de nuevos biomateriales es indispensable demostrar la capacidad del biomaterial para permitir el contacto con algún tejido existiendo una respuesta

favorable del huésped hacia el mismo, aceptándolo como propio y restableciendo la función previamente perdida. El primer paso para la evaluación de la biocompatibilidad son los ensayos “*in vitro*”, siendo favorables en reproducibilidad y predicción, para reducir u optimizar el número de pruebas a realizar en modelos animales.

2.4 Pruebas de biocompatibilidad

Los ensayos de citotoxicidad “*in vitro*” se incluyen en los estudios de primera fase para evaluación de los biomateriales y dispositivos médicos implantables. La evaluación citotóxica constituye una vía simple, rápida y económica para obtener información importante acerca de la biocompatibilidad de los biomateriales [40].

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado [41]. A partir de esta definición, se han desarrollado distintos tipos de pruebas “*in vitro*”, que permiten predecir los efectos tóxicos de sustancias y materiales, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y estandarizados se encuentra el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico, también conocido como MTT [42].

Este método es empleado para determinar la viabilidad celular, en base al número de células presentes en el cultivo, lo cual es medido mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables [43].

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a su forma insoluble formazán, este producto de la reacción, queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización empleando dimetilsulfóxido (DMSO). De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de

coloración del amarillo al azul [44]. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de ser expuestas a un material permite obtener información acerca de la toxicidad del material que se evalúa [45]. Sin embargo, el crecimiento y adhesión celular sobre biomateriales depende de las características superficiales de los materiales empleados y su grado de citotoxicidad [46]. En la fabricación de implantes biomédicos una de las propiedades que deben presentar es la capacidad de oseointegración. La oseointegración es un proceso mediante el cual el material implantando se integra al hueso donde es colocado, por lo cual se forma una sola fase en la que interactúan mutuamente generando nuevo tejido óseo desde el hueso hacia el implante y viceversa [47]. Mediante pruebas de adhesión celular “*in vitro*”, es posible predecir y determinar el grado de oseointegración de un biomaterial [48]. Se ha reportado la influencia de la rugosidad superficial y la composición química de los biomateriales sobre la adhesión y proliferación celular [49, 50].

2.5 Liberación de fármaco a partir de aleaciones anodizadas

Una de las principales complicaciones relacionada con el uso de materiales empleados en medicina, es el desencadenamiento de procesos infecciosos originados por la colonización de microorganismos en la superficie de los materiales durante el procedimiento quirúrgico [51, 52]. La mayoría de las infecciones asociadas a la utilización de implantes biomédicos son causadas por microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus* [53, 54].

La fuente de estos patógenos es generalmente el mismo paciente, aunque es posible también que pueda provenir del personal o del ambiente [55].

Staphylococcus aureus es considerada como una de las bacterias más virulentas y responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones asociadas a implantes biomédicos [56]. Las características principales de este microorganismo es que son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como

células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o en forma de racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, anaerobias facultativas y catalasa positivo. En medios de cultivo crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides. *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate ó el agar infusión cerebro corazón (ICC) [57]. La infección en el sitio quirúrgico, durante o después de una cirugía puede ser la causa del fracaso de un implante, por lo que el uso de antibióticos se ha convertido en un protocolo establecido para evitar la infección post-operatoria [58].

La gentamicina es un antibiótico de uso común para prevenir la infección bacteriana alrededor de materiales empleados como implantes. Es un antibiótico aminoglucósido, y puede tratar muchos tipos de infecciones bacterianas, particularmente infecciones provocadas por bacterias Gram-negativas. Funciona uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, interrumpiendo la síntesis de proteínas [59]. Al igual que todos los aminoglucósidos, cuando la gentamicina se administra por vía oral, no es eficaz. Esto es debido a que se absorbe desde el intestino delgado, y luego viaja hacia el hígado, donde es inactivado. Por lo tanto, sólo puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular o tópica. La administración por estas vías a menudo no es efectiva porque el fármaco no puede alcanzar fácilmente el sitio de infección en el tejido óseo, particularmente en el tejido necrótico o avascular que queda después de una cirugía. Esta limitación no puede ser superada con el aumento de dosis sistémicas debido a la toxicidad de los órganos asociados con los antibióticos a concentraciones más altas.

Por lo tanto, la terapia local antibiótica se ha convertido en una de las principales opciones para prevenir o combatir infecciones postoperatorias. Esto no sólo ofrece las ventajas de una alta concentración local de antibióticos sin toxicidad

sistémica, sino también una forma efectiva de administrar antibióticos en el sitio de implantación [60]. Los nanotubos obtenidos mediante el proceso de anodización en aleaciones de titanio, han sido reportados como uno de los sistemas de liberación de fármacos más prometedores en implantes biomédicos y son considerados como una de las principales alternativas para superar a los sistemas convencionales de administración de fármacos [61-63]. Las terapias convencionales basadas en la administración sistémica de fármacos presentan limitaciones y efectos secundarios asociados, mientras que la administración localizada de fármaco basada en estructuras nanotubulares podría ofrecer ventajas potenciales para tratar infecciones relacionadas con implantes óseos. Mediante estudios "*in vitro*", se ha demostrado la capacidad que tienen los nanotubos de titanio para cargar y liberar fármacos insolubles en agua usando a alambres e implantes de forma plana [64, 65]. Además, se ha investigado la cinética de liberación de nanotubos de titanio cargados con el fármaco gentamicina y su efecto sobre la reducción de la adhesión bacteriana en la superficie del material [60].

2.6 Referencias

1. X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface nano-functionalization of biomaterials, *Materials Science and Engineering:R: Reports*, 70 (2010) 275-302.
2. D.R. Buddy, S.H. Allan, J.S. Frederick, E.L. Jack, *Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, 2004.
3. M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Progress in Materials Science*, 54 (2009) 397-425.
4. D.R. Buddy, S.H. Allan, J.S. Frederick, E.L. Jack, *Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, 2004.
5. I.N. Ana Morato, Concha Toribio, *El Futuro de los Biomateriales: Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo*, in, Madrid, 2004.
6. K. Otsuka, C.M.Wayman. ed. *Shape Memory Materials*. ed. Cambridge University. 1999: United Kingdom. 98-99.
7. K. Otsuka, and C.M Wayman. *Review on the Deformation behavior of Materials vol 2*. Ed. Feltham. Freund, Tel Aviv, Israel, 1977.
8. K. Otsuka. Science and technology of shape memory alloy: new developments. *MRS bulletin*, Materials Research society, 2002. 27: p. 91-100.
9. R. Araya, M. Marivil, C. Mir, O. Moroni, A. Sepulveda. Temperature and Grain size effect on behavior of CuAlBe SMA Wires under Cyclic loading. *Mat. Sci and Eng*. 2008, 496: p. 209-213.

10. F. Boccio, F. J. Gil, M.V. Alfonso, A. Campos, E. Solano, J.A. Planell. Optimización Superficial de alambres de Ortodoncia de TiNi Superelástico mediante Nitruración gaseosa. Parte II: Cuantificación de la Mejora de la Nanodureza y Coeficiente de Fricción. Biomecánica, VII, 13(39-45), 1999.
11. S. Domingo, S. Puértolas, F. Sánchez, L. Gracia- Villa y J. A. Puértolas., Aplicación de la Superelásticidad del TiNi a los Stents: Consideraciones termoeléctricas. VIII congreso nacional de las propiedades mecánicas de sólidos, Gandia 2002. P. 417-424.
12. A. K. Danilov, S. Kujala, J. Saaranen, J. Ryhänen, A. Pramila, T. Jamás, J. Tuukkanen. Biocompatibility of Austenite and Martensite in TiNi based alloys. Journal de physique, 2003. IV: p. 345-367.
13. Wataha, J. C., O'Dell, N. L., Singh, B. B., Ghazi, M., Whitford, G. M. and Lockwood, P. E. (2001), Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release in vivo. J. Biomed. Mater. Res., 58: 537–544.
14. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour, Materials Science and Engineering: C, Volume 23, Issue 4, 10 June 2003, Pages 551-560, ISSN 0928-4931.
15. Shabolovskaya SA (2002), Surface, corrosion and biocompatibility aspect of Nitinol as an implant materials, Biomedical Materials and Engineering, 12, 69-109.
16. H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. Biomaterials 2001; 22: 1253-62.

17. Y. Li, C. Wong, J. Xiong, P. Hodgson, C. Wen. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *Dent Res* 2010; 89: 493-7.
18. Yamamoto, R. Honman, M. Sumita. Cytotoxicity evaluation of 43 melt salt using murine fibroblast and osteoblastic cells. *Biomed Mater Res* 1998; 39: 331-40.
19. J. Vilaplana, C. Romaguera. New develops in jewellery and dental materials. *Contact Dermatitis* 1998; 39: 55-7.
20. S.M Venkateswara, V. Ilankumaran, R.N. Srinivasa. Trends in cardiac pacemaker batteries. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 2004; 4: 201-12.
21. Y. Al- Zain, H. Y. Kim, H. Hodosa, T. H. Nam, S. Miyazaki. Shape Memory properties of TiNbMo Biomedical Alloys. *Acta materialia* 58 (2010) 4212-4223.
22. M. R. Filonov, V. Brailovski, S. D. Prokoshkin, Y. S. Zhukova, S. M. Dubinsky. A study of structure formation in TiNbZr Shape Memory Alloys for Medical Application. *Journal of physic: conference series* 291 (2011).
23. M. Arciniegas, J. Peña, J. M. Manero, J. A. Planell, F. J. Gil. Caracterización Mecánica y Microestructural de nuevas Aleaciones Multifuncionales de Titanio β libres de Ni para aplicaciones Biomédicas. Centro de investigación en ingeniera Biomédica. Universidad Politécnica de Catalunya. *Biomecánica, órgano de la Sociedad Ibérica de Biomécanica y Biomateriales* 15 (2007) p. 23-27.

24. Luis López Pavón, Hee Young Kim, Hideki Hosoda, Shuichi Miyazaki, Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti–24Zr–(8–12) Nb–2Sn alloys, Scripta Materialia, Volume 95, 15 January 2015, Pages 46-49, ISSN 1359-6462.
25. D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, and P. Thomsen, in Titanium in medicine, Springer, p.171 (2001).
26. Chang Yao, Thomas J. Webster J Anodization: a promising nano-modification technique of titanium implants for orthopedic applications. Nanosci Nanotechnol. 2006 Sep-Oct; 6(9-10): 2682–2692.
27. Kulkarni, M., Mazare, A., Schmuki, P., & Iglič, A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. Nanomedicine, 111, 111.
28. U.R Evans, Corrosiones Metálicas, Editorial Reverté, ISBN 84-291-6044-2, (2003).
29. C. A. Grimes, G. K. Mor, TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications, in, Springer, 2009, pp. 358.
30. J. Wang, Z. Lin, Anodic Formation of Ordered TiO₂ Nanotube Arrays: Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential, The Journal of Physical Chemistry C, 113 (2009) 4026-4030.
31. C.L. Chok, B.L. NG, F.K. Yam, The effects of fluoride-based electrolyte concentrations on the morphology of self-organized titania nanotubes, Optoelectronics and advanced materials – rapid communications, 4 (2010) 148-150.

32. Poulomi Roy, Steffen Berger, and Patrik Schmuki, TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 50, Issue 13, pp. 2904 – 2939, (2011).
33. Hernández López, J. M. (2015). Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas.
34. Qiang Liu, Dongyan Ding, and Congqin Ning, “Anodic Fabrication of Ti-Nb-Zr-O Nanotube Arrays,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, Article ID 240346, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/240346.
35. Z. H. Li, C. Q. Ning, D. Y. Ding, H. G. Liu, and L. Huang, “Biological properties of Ti-Nb-Zr-O nanostructures grown on Ti₃₅Nb₅Zr alloy,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, Article ID 834042, 7 pages, 2012.
36. X. J. Feng, J. M. Macak, S. P. Albu, and P. Schmuki, “Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface, *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 2, pp. 318–323, 2008.
37. D. Q. Martins, W. R. Osório, M. E. P. Souza, R. Caram, and A. Garcia, “Effects of Zr content on microstructure and corrosion resistance of Ti-30Nb-Zr casting alloys for biomedical applications,” *Electrochimica Acta*, vol. 53, no. 6, pp. 2809–2817, 2008.
38. Robin, A., et al. (2014) Formation of TiO₂ Nanotube Layer by Anodization of Titanium in Ethylene Glycol-H₂O Electrolyte. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 4, 123-130.

39. Eun-Sil Kim, Yong-Hoon Jeong, Han-Cheol Choe, William A. Brantley, Formation of titanium dioxide nanotubes on Ti-30Nb-xTa alloys by anodizing, Thin Solid Films, Volume 549, 31 December 2013, Pages 141-146, ISSN 0040-6090.
40. Ríos Hernández, M., & Cepero Cañas, J. (2006). Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 37(3).
41. Repetto, M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición; 2002. p.303-305.
42. Fentem J.H. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. Human Experimental Toxicology 1994; 13 (2):445-449.
43. Shayne G.C. Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. General and applied toxicology, vol 1. USA: Grove's dictionaries Inc; 1999. p.178-182.
44. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B.J, Boobis A. Methods of in vitro toxicology. Food Chem Toxicol 2002; 40(2):193-236.
45. Jiménez N, González M, Fernández C, López J. Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. Biomecánica 2007;15 (1):63-71.

46. Gómez R., Javier Enrique; Forero Gómez, Luis Emilio; Escobar Rivero, Patricia; Valdivieso Q., Wilfredo; (2007). Estudio de citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma en Ti6Al4V superficialmente modificado. *Scientia Et Technica*, XIIIseptiembre-Sin mes, 85-89.
47. Braceras I, Onate J.I. Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys. *Surface & Coatings Technology* 196 (2005) 321-326.
48. Schwartz Z. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Res* 13, (1999) 38-48.
49. Jayaramann M, Meyer U. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25 (2004) 625 – 631.
50. Xiaolong Zhu, Chen J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 25 (2004) 4087 – 4103.
51. Popat, K. C., Eltgroth, M., LaTempa, T. J., Grimes, C. A., & Desai, T. A. (2007). Titania Nanotubes: A Novel Platform for Drug-Eluting Coatings for Medical Implants. *Small*, 3(11), 1878-1881.
52. Campoccia D, Montanaro L, Arciola C R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006; 27 (11): 2331-9.
53. Tsukayama D. Infection after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 1996; 78: 512.

54. Fitzgerald R Jr. et al. Treatment of the infected total hip arthroplasty. *Curr Opin Orthop* 1999; 5: 26-30.
55. GRISTINA A G. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg* 1985; 67-A: 264-73.
56. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-2896.
57. Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
58. Ahmad, N. & Saad, N. Effects of antibiotics on dental implants: a review. *J. Clin. Med. Res.*, 4(1):1-6, 2012.
59. Tripathi, K. D. (2008). *Farmacología en odontología: fundamentos*. Ed. Médica Panamericana.
60. Popat, K. C., Eltgroth, M., LaTempa, T. J., Grimes, C. A., & Desai, T. A. (2007). Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials*, 28(32), 4880-4888.
61. Losic D, Simovic S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009; 6:1363–1381.

62. Zwillig V, Darque-Ceretti E, Boutry-Forveille A, David D, Perrin MY, Aucouturier M. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surf Interface Anal.* 1999; 27:629–637.
63. Wang, Q., Huang, J. Y., Li, H. Q., Chen, Z., Zhao, A. Z. J., Wang, Y., ... & Lai, Y. K. (2016). TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *International journal of nanomedicine*, 11, 4819.
64. Gulati K, Kant K, Findlay D, Losic D. Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *J Mater Chem B.* 2015; 3:2553–2559.
65. Aw MS, Gulati K, Losic D. Controlling drug release from titania nanotube arrays using polymer nanocarriers and biopolymer coating. *Biomater Nanobiotech.* 2011; 2:477–484.

3. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se detalla la metodología experimental seguida en esta investigación. En este proyecto de investigación se evaluó la biocompatibilidad de la aleación superelástica Ti-24Zr-10Nb-2Sn; lo anterior se llevó a cabo mediante el empleo de cultivos celulares. De igual manera, se mejoró el grado de biocompatibilidad “*in vitro*” de la aleación mediante la funcionalización superficial con nanoestructuras de TiO₂ por la técnica de anodizado, caracterizando la morfología y composición por microscopía electrónica de barrido. Adicionalmente se estudió la capacidad de la aleación anodizada para cargar y liberar fármaco así como sus propiedades antibacterianas, las pruebas “*in vivo*” consistieron en la implantación quirúrgica de la aleación en la mandíbula de ratas, estudiando la evolución y regeneración del tejido óseo por un periodo de 30 días. En estas pruebas se utilizó como control una aleación TiNi, la cual ha sido ampliamente utilizada en el área de ingeniería biomédica.

A continuación, se incluye un esquema en el que se resumen el desarrollo experimental realizado en este proyecto (figura 3.1).

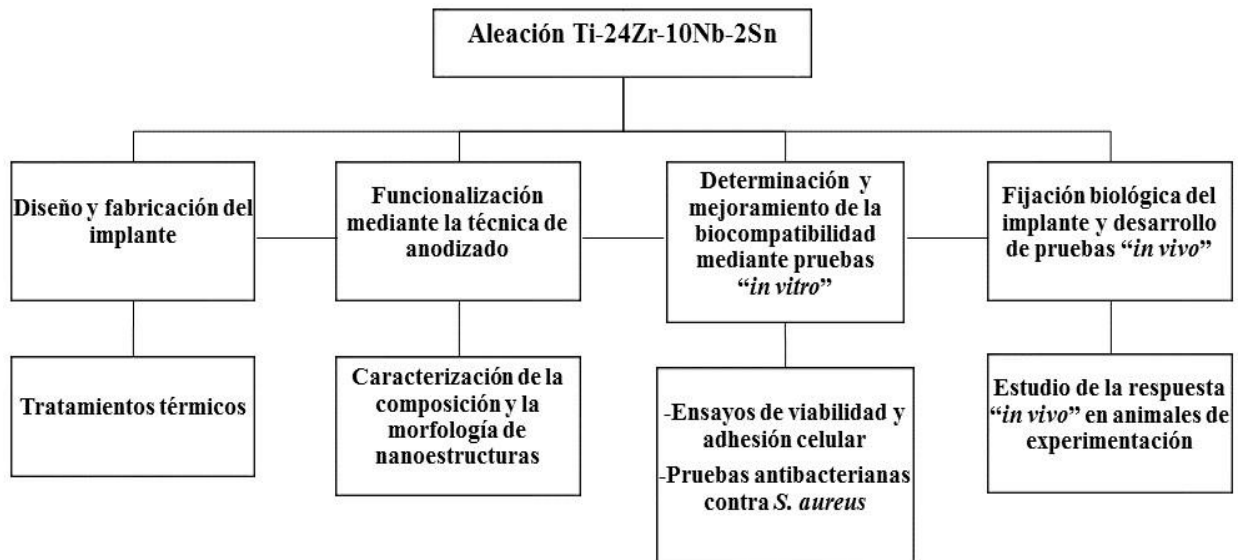


Figura 3.1.- Estrategia general que muestra el desarrollo experimental realizado este proyecto

3.1 Aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn

La aleación fue elaborada en la ciudad de Tsukuba, Japón por un grupo de investigación en el que participó el Dr. López Pavón. Se elaboró mediante la fusión por arco eléctrico de los elementos en un horno de alto vacío y bajo una atmosfera inerte. La aleación fue fundida 6 veces para garantizar su homogeneidad, además fue rolada en frío, disminuyendo su espesor un 97% lo que genera las excepcionales propiedades mecánicas.

3.2 Tratamientos térmicos

Primeramente, las aleaciones se limpiaron para evitar contaminantes, se realizó un proceso de decapado utilizando una mezcla de agua (H_2O), ácido nítrico (HNO_3) y ácido fluorhídrico (HF) en relación 5:4:1 durante 10 segundos. Posteriormente, las aleaciones se encapsularon en un tubo de cuarzo, haciendo un alto vacío para después suministrar un flujo de argón. Por último, se llevó a cabo un tratamiento térmico a 900 °C por 30 minutos seguido de un enfriamiento rápido en agua sin romper la cápsula, para evitar que se formara la fase ω y solamente preservar la fase austenita. Se ha reportado en estudios previos que este tratamiento es el que ha obtenido mejor superelasticidad en este tipo de aleaciones [1].

3.3 Funcionalización por anodizado y caracterización de la superficie con las nanoestructuras

Para realizar la técnica de anodizado se empleó una celda electroquímica de dos electrodos, en la que el ánodo fue la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn (láminas de 10 mm ancho, 10 mm de largo y 0.11 mm de espesor) donde se pretendía crecer la capa de óxido y el cátodo fue una placa de platino, un material químicamente inerte en el baño de anodizado. Ambos electrodos se conectaron a un circuito

eléctrico externo para establecer una diferencia de voltaje entre ellos mediante un alambre de cobre de 100 mm con una distancia de separación de 10 mm (figura 3.4).

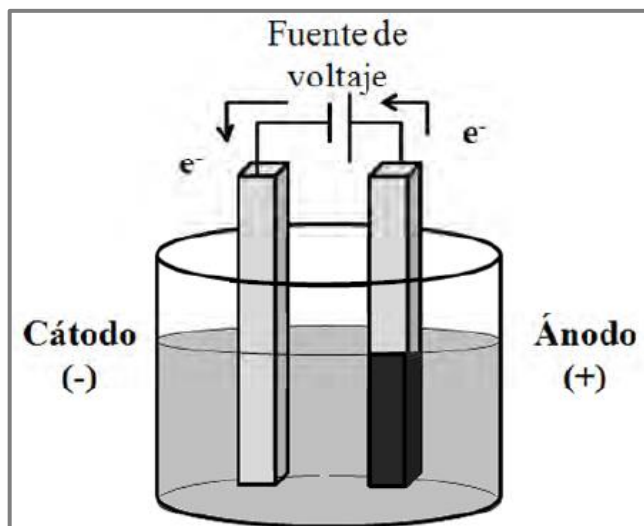


Figura 3.4.- Esquema de una celda electroquímica de dos electrodos empleada para la técnica de anodización.

La morfología, composición y espesor de las capas anódicas se modifican en función de los diferentes parámetros del proceso de anodizado, en este proyecto de investigación se empleó una solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a una concentración de 1 M y NH_4F a una concentración de 0.25 M con un voltaje constante de 5, 10, 15, 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente. El crecimiento de las capas anodizadas sobre la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn son dependientes tanto del voltaje como del tiempo, influyendo dichos parámetros en la morfología, el espesor y en la eficiencia del proceso de anodizado. El análisis morfológico y elemental de las aleaciones anodizadas se realizó con un Microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEM™ 200, equipado con un detector EDXS (Energy-dispersive Xray) (figura 3.5). Lo que nos permitió determinar si las capas crecidas sobre las aleaciones están formadas por una matriz nanoestructurada de óxido de titanio. No se necesitó realizar un tratamiento adicional de recubrimiento para la caracterización de las muestras.

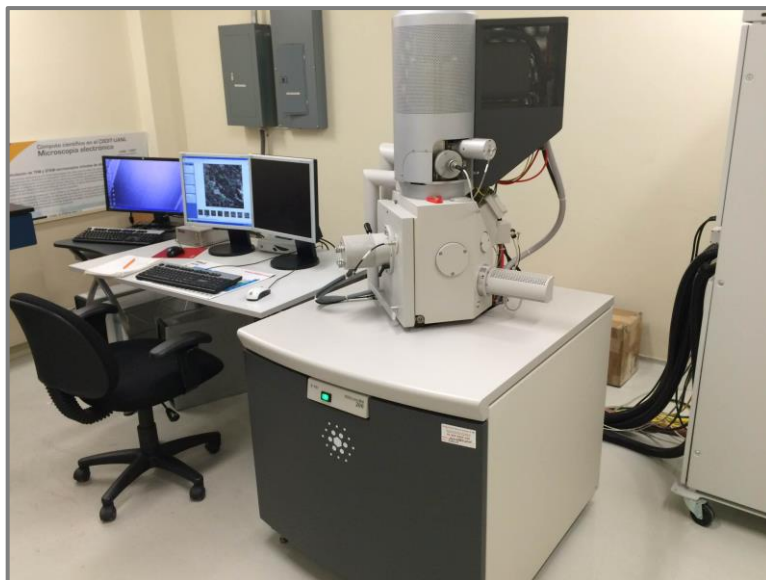


Figura 3.5.- Microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEM™ 200.

3.4 Cultivo primario de osteoblastos

Los osteoblastos se obtuvieron de un cultivo primario, a partir de la extracción de huesos de la calvaria de ratas albinas de la variedad Wistar de 0-2 días de nacidas. Para eliminar restos de tejidos, los huesos extraídos se desinfectaron con iodopovidona y se lavaron con una solución tamponada estéril PBS, (Phosphate Buffered Saline), a la que se le añadió antibiótico antimicótico (penicilina G sódica 100 µg/mL, sulfato de estreptomicina 100 µg/mL y anfotericina B 2.5 µg/mL) para prevenir contaminaciones. Tras ello, se cortaron los huesos en pequeños fragmentos (2-3 mm), incubándolos por 30 minutos en tubos eppendorf con 1 mL de collagenasa (1mg/mL) a 37°C. Una vez pasado este tiempo se procedió a recuperar el sobrenadante y se depositó en un tubo eppendorf nuevo estéril, centrifugando esto a 4000 rpm por 3 minutos. La muestra se decantó y se resuspendió en 1 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, ácido ascórbico (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL), dexametasona (100 nM) y β-glicerofosfato (10 mM), posteriormente se añadió esta muestra a un frasco para cultivo celular F-25 con 4 mL del medio de cultivo ya mencionado, la incubación de la muestra

se realizó a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. El proceso anterior se repitió con los fragmentos de hueso restantes durante las siguientes 2 y 4 horas con el fin de extraer el mayor número de células óseas posibles.

3.4.1 Caracterización de osteoblastos

Para analizar y diferenciar osteoblastos, a partir de la extracción de células de cultivo primario, se pueden aplicar técnicas de tinción para la identificación de estas células. Los osteoblastos producen la enzima fosfatasa alcalina, una enzima localizada en las vesículas de la matriz extracelular como una proteína fijada a un glicolípido de fosfatidilinositol, esta enzima, inicia la mineralización en la superficie de estas vesículas y su función es hidrolizar fosfatos orgánicos para liberar fosfatos inorgánicos al sitio de mineralización de dichas células. La presencia de fosfatasa alcalina puede ser confirmada mediante la coloración de la enzima e indica la presencia de osteoblastos en un cultivo celular [2]. En este proyecto la caracterización de osteoblastos se llevó a cabo mediante la tinción de fosfatasa alcalina, para ello se empleó el kit de tinción para fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich, siguiendo las indicaciones del fabricante. Un total de 5×10^4 células fueron cultivadas en microplacas de 96 pozos, una vez en confluencia (3-5 días de incubación), previo a la tinción, las células se fijaron retirando el medio de cultivo, lavando cada pozo con agua desionizada y agregando en una solución de citrato, acetona y formaldehído al 37% por 30 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pozos durante 45 segundos con agua desionizada, a continuación, se adicionó el reactivo de fosfatasa alcalina (Naphthol AS-BI Alkaline solution, FRV-Alkaline solution y FBB-Alkaline solution), incubando las células en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se retiró el reactivo de fosfatasa alcalina y se lavó con agua desionizada por 2 minutos, tras esto, se realizó una contratinción con hematoxilina durante 2 minutos, al finalizar, las células se lavaron con agua de grifo y se observaron en un microscopio invertido. Se consideró como positiva la coloración que indicaba una tinción roja en las células.

3.5 Pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”

3.5.1 Cultivo celular

Los cultivos celulares para las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*” se iniciaron sembrando una cantidad de 5×10^4 células del cultivo primario de osteoblastos en frascos de cultivo celular F-25 con 4 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, ácido ascórbico (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL), dexametasona (100 nM) y β -glicerofosfato (10 mM) a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Una vez en confluencia (3-5 días de incubación), se procedió a tripsinizar el cultivo, para ello se retiró el medio de la placa de cultivo y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS para debilitar la adherencia de las células al frasco, paso seguido se incorpora al frasco de cultivo 500 mL de tripsina, moviendo horizontalmente el frasco por 1 minuto para cubrir toda la superficie, a continuación, se incubó el frasco durante 3 minutos a 37 °C, tras este tiempo de incubación se adicionó 1 mL de SFB, homogeneizando la suspensión con una micropipeta para evitar la aglomeración celular. Una vez hecho esto, se ajustó la densidad poblacional, para cultivar las células en microplacas estériles, contando las células en una cámara de Neubauer, el número de células que se inocularon por pozo depende de cada ensayo y del número de células obtenidas por mililitro. Este procedimiento fue estandarizado para las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”: el ensayo de citotoxicidad por MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) y las pruebas de adhesión celular por microscopía de fluorescencia.

3.5.2 Preparación de las aleaciones

Se realizó el proceso de anodización de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn (láminas de 5 mm ancho, 5 mm de largo y 0.11 mm de espesor) a los voltajes predeterminados [5, 10, 15 y 20 Volts], una vez terminado este proceso, las aleaciones anodizadas y los controles (láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar) se colocaron por triplicado en microplacas de 24 pozos y se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS para eliminar residuos contaminantes. Posteriormente se llevaron a esterilizar por medio de radiación ultravioleta a 254 nm durante 40 minutos, para proceder a realizar las pruebas de biocompatibilidad del material.

3.5.3 Ensayo de citotoxicidad por MTT

Se estudió el efecto citotóxico de las aleaciones, mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Para ello se utilizó una microplaca de 96 pozos previamente esterilizada con las aleaciones anodizadas [5, 10, 15 y 20 Volts], los controles de la aleación TiNi, Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar y células libres de aleación como control positivo (cada una de las aleaciones por triplicado). En condiciones de esterilidad, se inoculó sobre la superficie de cada aleación un total de 2×10^4 células. Tras esto, la microplaca se llevó a incubar a 37 °C por 30 minutos para permitir la adhesión de las células a las aleaciones. Una vez pasado este tiempo, se agregó a cada pozo 1 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, ácido ascórbico (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL), dexametasona (100 nM) y β -glicerofosfato (10 mM), incubando las muestras durante 3 días a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Después del periodo de incubación, se añadieron 10 μ L de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) a cada pozo, incubando las muestras a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 2 horas en condiciones de oscuridad. Una vez transcurrido este

tiempo se retiró el medio y se añadieron 100 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver el producto formado; los cristales de formazán MTT reducido (El resultado de la reducción es un cambio de color de la molécula MTT). A continuación, se realizó la cuantificación de células viables (la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido), empleando un lector de microplacas marca Thermo Scientific TM modelo Multiskan FC, con una absorbancia de 570 nm (figura 3.6), empleando DMSO como blanco. Para finalizar, se realizaron los cálculos correspondientes con la densidad óptica obtenida y se graficaron los resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013. El procedimiento descrito anteriormente se realizó en dos ocasiones más con un periodo de incubación de 5 y 7 días, con cambio de medio cada tercer día para mantener el cultivo en condiciones óptimas.



Figura 3.6.- Lector de microplacas marca Thermo Scientific TM modelo Multiskan FC.

3.5.4 Pruebas de adhesión celular por Microscopía de Fluorescencia

Se estudió la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones mediante microscopía de fluorescencia. Para realizar esta prueba se empleó una microplaca de 24 pozos, esterilizada con anterioridad con las aleaciones anodizadas [5, 10, 15 y 20 Volts], los controles TiNi y Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar y células libres de aleación como control positivo (cada una de las

aleaciones por triplicado). En condiciones de esterilidad, se inoculó sobre la superficie de cada aleación un total de 5×10^4 células. Tras esto, la microplaca se llevó a incubar a 37 °C por 30 minutos para permitir la adhesión de las células a las aleaciones. Al pasar este tiempo, sobre el borde de cada pozo, se agregó 2 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, ácido ascórbico (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL), dexametasona (100 nM) y β -glicerofosfato (10 mM), incubando las muestras durante 72 horas a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS estéril, al terminar los lavados, las células fueron fijadas con 500 μ L de paraformaldehído al 4% durante 5 minutos, tras esto se retiró la solución fijadora y se realizaron nuevamente 2 lavados con 2 mL de PBS estéril, a continuación, las células se permeabilizaron con tritón 1x por 2 minutos, después del tiempo de permeabilización, se retiró la solución y lavaron las células con PBS estéril. Las células se tiñeron con un marcador fluorescente, DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) y se observaron con un microscopio de fluorescencia marca ZEISS modelo Axio Imager, a 358 nm (figura 3.7). Las imágenes se tomaron con la cámara digital integrada al microscopio y se analizaron utilizando el software AxioVision, proporcionado por el fabricante.



Figura 3.7.- Microscopio de fluorescencia marca ZEISS modelo Axio Imager.

3.6 Pruebas antibacterianas contra *S. aureus*

3.6.1 Pruebas de liberación de fármaco

Se realizó el proceso de anodización de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn (láminas de 10 mm ancho, 10 mm de largo y 0.11 mm de espesor) a los voltajes predeterminados [5, 10, 15 y 20 Volts], como controles de la aleación se emplearon láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar. Para la carga y medición se empleó como fármaco sulfato de gentamicina al 1% (p/v) en agua. Primeramente, las aleaciones se limpiaron con agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, se pipetearon 500 μ L del fármaco sobre la superficie de los anodizados y se dejó secar al aire a temperatura ambiente, eliminando el exceso de fármaco con un paño. Este proceso se repitió 20 veces con el objetivo de cargar una cantidad sustancial de fármaco sobre la matriz nanoestructurada de las aleaciones. Posteriormente, las aleaciones cargadas con el fármaco fueron sumergidas en 1.5 mL de PBS. Tras ello, se tomaron 5 μ L de esta solución y se procedió a medir la liberación de sulfato de gentamicina, empleando un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop de la marca Thermo Scientific modelo 2000 a 296nm (figura 3.8). El proceso de liberación fue medido desde los primeros 5 minutos hasta 24 horas, empleando PBS como blanco. Tras finalizar, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes con la densidad óptica obtenida y se graficaron los resultados empleando el programa OriginPro en su versión 8.



Figura 3.8.- Espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop de la marca Thermo Scientific modelo 2000.

3.6.2 Activación del microorganismo

La cepa de *S. aureus* se activó mediante resiembras sucesivas, 5 días previos a las pruebas, agregando a 3 tubos de 13x100 mm conteniendo 5 mL de medio de cultivo ICC caldo estéril, un inóculo de 100 μ L de bacteria en condiciones de esterilidad, posteriormente se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, el procedimiento se realizó nuevamente durante los días restantes.

3.6.3 Método del antibiograma

La determinación de la sensibilidad de *S. aureus* al antibiótico gentamicina (160 mg/ 16 mL), consistió en depositar en condiciones de esterilidad, discos de las aleaciones anodizadas [5, 10, 15 y 20 Volts] cargados y no cargados con el antibiótico gentamicina sobre la superficie de agar ICC contenido en una placa de Petri previamente inoculada con *S. aureus*. Tan pronto como los discos de las aleaciones cargadas con el antibiótico se ponen en contacto con la superficie del agar, el antibiótico difunde de manera radial formándose un gradiente de concentración. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. Se midió el diámetro de la zona de inhibición

y los resultados se interpretaron como: sensible ≤ 12 mm, intermedio 13-14 mm y resistente ≥ 15 mm. Como control positivo de inhibición se utilizó un disco de papel filtro impregnado con el antibiótico gentamicina y como controles de la aleación se emplearon discos de TiNi y discos de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar.

3.6.4 Método de espectrofotometría

Se tomó un inóculo inicial de 100 μ L de *S. aureus* previamente activada y las aleaciones anodizadas y sin anodizar a evaluar [5, 10, 15 y 20 Volts] (láminas de 5 mm ancho, 5 mm de largo y 0.11 mm de espesor), se colocaron en tubos de 13x100 mm conteniendo un volumen de 5 mL de medio de cultivo ICC caldo estéril, los tubos se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, posteriormente, se procedió a leer las absorbancias de los tubos a 635 nm en un espectrofotómetro marca GENESYS™ modelo 5 (figura 3.9), a continuación, se realizaron los cálculos correspondientes a los valores obtenidos y se graficaron estos resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013.



Figura 3.9.- Espectrofotómetro marca GENESYS™ modelo 5.

3.6.5 Método de vertido en placa

De los datos obtenidos por el método de espectrofotometría, en tubos 13x150mm conteniendo un volumen de 9 mL de solución salina fisiológica 0.85% estéril, se agregó 1 mL del medio de cultivo que contenían las aleaciones, realizando diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-12} , posteriormente se realizó la técnica de vertido en placa, agregando 1 mL de las diluciones 10^{-8} a 10^{-12} en placa de Petri por triplicado para cada una de las muestras, a continuación en condiciones de esterilidad, a las placas de Petri se les vertió 15 mL de agar ICC, homogenizando la muestra 8 veces la forma de 8, dejando solidificar el agar a temperatura ambiente, ya solidificado el agar, las placas de Petri se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, después de este tiempo se determinó la actividad antibacteriana de las muestras por el método de recuento en placa, realizando los cálculos correspondientes al número de colonias obtenidas y graficando estos resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013.

3.7 Diseño y fabricación de la placa mandibular a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn

Para el diseño de la placa mandibular, se empleó un software de diseño asistido por computadora utilizado para dibujo 2D y modelado 3D, AutoCAD en su versión 21.1. Debido a la superelasticidad de la aleación, este diseño permite una fácil adaptación a los requerimientos funcionales y condiciones físicas de los animales de experimentación, pues el material puede abrirse y una vez implantado ajustarse a la estructura del hueso sin perder sus propiedades mecánicas debido a las grandes deformaciones recuperables que soporta.

La fabricación se llevó a cabo en un taller especializado, en donde usando una cortadora de hilo por electroerosión (EDM), las aleaciones se cortaron en secciones de 15 mm de diámetro por 10 mm de largo. Además, se realizaron 6 orificios circulares en los extremos de la aleación empleando un taladro especial, con una broca helicoidal de 1/32", con la finalidad de poder realizar una

mejor sujeción (figura 3.2). Para estudiar placas dentales, es necesario utilizar un modelo que sea reproducible y en el que las dimensiones de la placa sean comparables a las utilizadas en seres humanos. Independientemente del diseño, las placas deben tener un tamaño adecuado para la especie elegida y para el sitio de implantación ósea [3]. En este proyecto de investigación, se diseñó y fabricó una placa mandibular a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn (figura 3.3), las dimensiones de las placas para los estudios “*in vivo*” se basaron en el tamaño del animal de experimentación ratas macho albinas de la variedad Wistar y el hueso elegido; la mandíbula. La placa propuesta en esta investigación permite, en combinación con los tornillos fabricados de acero inoxidable, estabilizar una fractura ósea hasta su regeneración. Los orificios redondos en la placa que permiten colocar los tornillos en posición céntrica, y éstos, durante su inserción, ejercerán una fuerza perpendicular a su eje provocando así la compresión del foco de la fractura, el diseño de la placa reproduce la anatomía de la región mandibular y los tornillos autorroscantes que acompañan la placa se usaron como medio de tracción para asegurar la compresión entre los dos fragmentos mandibulares.

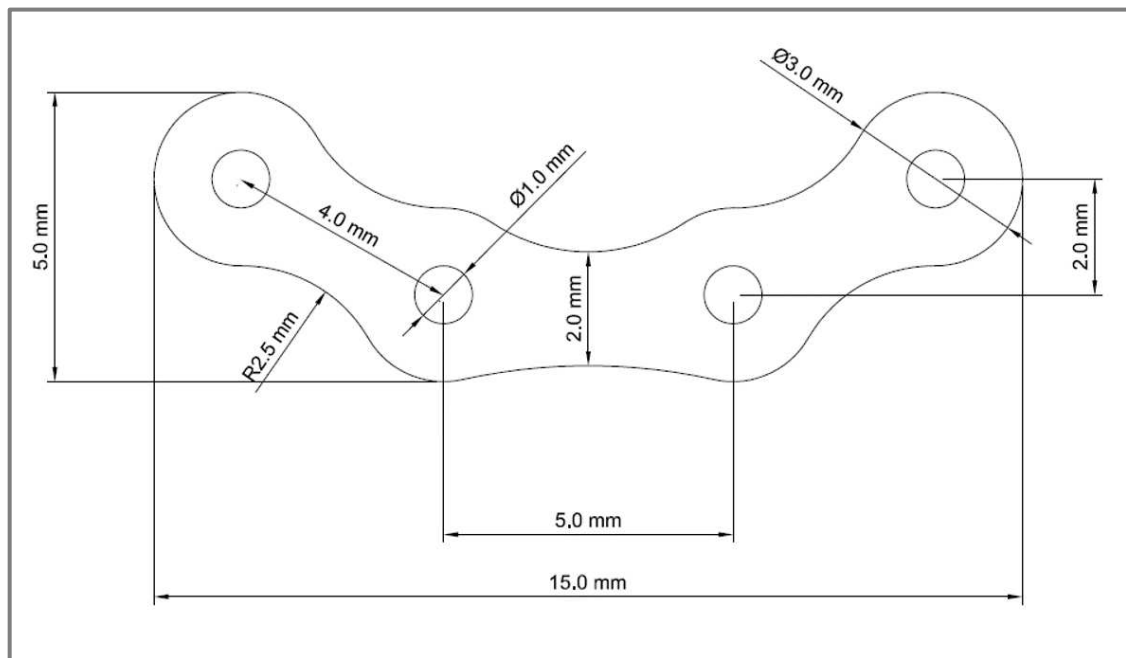


Figura 3.2.- Propuesta realizada para el diseño y fabricación de la placa mandibular a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn.

Como ya se mencionó, la fijación de los tornillos al hueso a través de la placa requiere de una interfaz hueso-placa estable para la transmisión de las fuerzas. Esta estabilidad de la interfaz hueso-placa depende no solamente del diseño sino también de la superficie del implante [4], la cual juega un papel significativo en el éxito de las placas dentales debido a su interacción no solo con el sitio de implantación si no también con el tejido circundante [5]. En este proyecto el grado de biocompatibilidad y oseointegración “*in vivo*” de la placa se mejoró mediante la funcionalización superficial de la aleación mediante el tratamiento de anodizado, lo cual dio como resultado la formación de nanotubos de TiO_2 .



Figura 3.3.- Imagen representativa de la placa mandibular fabricada a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn.

3.8 Fijación biológica de la placa mandibular y desarrollo de pruebas “*in vivo*”

Para la fijación biológica de la placa y el desarrollo de las pruebas “*in vivo*” en este proyecto se emplearon como modelo animal, ratas albinas de la variedad Wistar, un animal de laboratorio muy utilizado para la experimentación en ingeniería biomédica. Las características principales de estos modelos fueron: ratas de sexo indistinto, con tres meses de edad y un peso entre 280 a 320 gramos aproximadamente. Las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de estos animales de experimentación se apegaron estrictamente a la norma

oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El desarrollo de las pruebas “*in vivo*” consistió en la implantación quirúrgica de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, realizando una fractura vertical a lo ancho de la mandíbula de las ratas, todo en condiciones de esterilidad. La implantación de la aleación permitió la unión del hueso fracturado, promoviendo la regeneración ósea. Este procedimiento se realizó en un grupo de ratas en el cual se implantó la aleación funcionalizada con nanoestructuras de óxido de titanio. Se estudió la evolución y regeneración del tejido óseo en presencia de la aleación por un periodo de 30 días, lo que nos permitió evaluar la respuesta de los tejidos vivos.

3.9 Referencias

1. Luis López Pavón, Hee Young Kim, Hideki Hosoda, Shuichi Miyazaki, Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti–24Zr (8–12) Nb–2Sn alloys, Scripta Materialia, Volume 95, 15 January 2015, Pages 46-49, ISSN 1359-6462
2. Hamade E, Azzar G, Radisson J, Buchet R, Roux B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. Eur J Biochem. 2003; 270:2082–90.
3. Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E. & Pearce, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater 13, 1–10 (2007).
4. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE (2001) Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. J Biomed Mater Res 54: 209-215.
5. R.M. Pilliar, Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. Implant. Dent. 7 (1998) 305-314.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Introducción

En el presente capítulo se muestran los resultados de los experimentos descritos en el capítulo anterior. El capítulo comienza con el análisis de las curvas de corriente contra el tiempo que indican el crecimiento de las capas de nanotubos sobre la superficie de las aleaciones obtenidas mediante el proceso de anodización, posteriormente se presentan y discuten los resultados de la caracterización de la morfología y composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn. A continuación, se describen y discuten los resultados de las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”, primero, se presentan los resultados del estudio de la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones anodizadas mediante microscopía de fluorescencia, seguido de la evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de sobre las células de cultivo primario por el ensayo colorimétrico de MTT, empleado para cuantificar la viabilidad celular. Además, se estudiaron los perfiles de liberación del fármaco gentamicina en las aleaciones anodizadas y se determinaron las propiedades antibacterianas sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, empleando las técnicas microbiológicas del antibiograma, la técnica de espectrofotometría y el recuento bacteriano en placa. Por último, en este capítulo, se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de biocompatibilidad “*in vivo*”, se describe la implantación quirúrgica de la aleación funcionalizada con nanoestructuras de óxido de titanio y se discute la evolución y regeneración del tejido óseo.

4.2 Análisis de las curvas de densidad de corriente tiempo que indica el crecimiento de las capas anódicas en la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn

Como se comentó en el capítulo anterior, el crecimiento de las nanoestructuras sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn se llevó a cabo mediante un barrido potencial con voltajes constantes de 5, 10, 15 y 20 V en una solución electrolítica de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a una concentración de 1 M y NH_4F a una concentración de 0.25 M durante 30 minutos a 25°C. En todos los experimentos realizados, los gráficos de la densidad de corriente contra el tiempo que representan los anodizados de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn comprendían diferentes etapas: una primera etapa con un aumento de corriente, en donde inicialmente existe la formación de una capa de óxido compacta, posteriormente la superficie se activa localmente y los poros comienzan a crecer aleatoriamente, debido al crecimiento de los poros, el área activa aumenta también, lo que da como resultado un aumento en la densidad de corriente, hasta que alcanza un valor máximo. A continuación, dado que los poros comienzan a interferir entre sí, la densidad de corriente disminuye progresivamente hasta alcanzar un valor estacionario, y una estructura auto-ordenada sigue creciendo con el tiempo hasta el término de la anodización después de 1800 segundos [1-4]. Es importante el control del tiempo en el proceso de anodización ya que una variación en el mismo puede modificar las dimensiones de la capa de nanotubos [5].

La línea continua de la figura 4.1 muestra una gráfica de densidad de corriente contra tiempo de anodizado a un potencial constante de 5 V. En dicha gráfica se observa un rápido aumento en la densidad de la corriente hasta aproximadamente 25 mA/cm² y luego cae a un valor constante de aproximadamente 10 mA/cm², hasta que la anodización termina después de 1800 s.

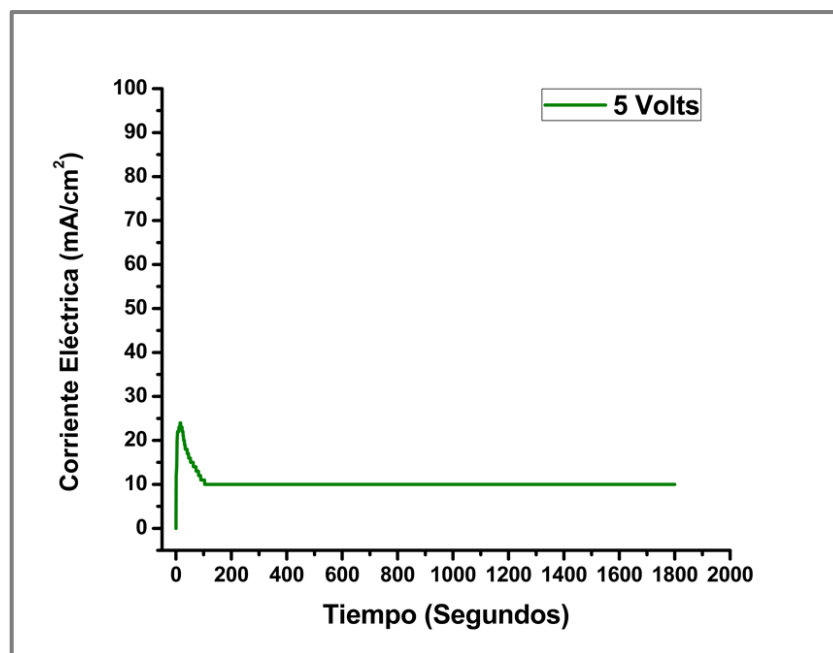


Figura 4.1.- Curva densidad de corriente-tiempo que indica el crecimiento de una capa anódica a 5 Volts en una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4F a temperatura ambiente.

En la figura 4.2 de la misma forma que en la figura anterior se muestra el comportamiento de la corriente contra el tiempo de anodizado, ahora a un potencial constante de 10 V. En este caso, la densidad de la corriente aumenta rápidamente hasta aproximadamente 50 mA/cm², luego cae a un valor constante de 20 mA/cm² durante los primeros 1200 s, posteriormente tiene una nueva caída de corriente en aproximadamente 18 mA/cm², hasta el término de la anodización, estas caídas de corriente se atribuyen como ya se mencionó a la interferencia mutua entre los poros lo que provoca el crecimiento continuo de la capa auto-ordenada de nanotubos a lo largo del tiempo de anodización [4, 6].

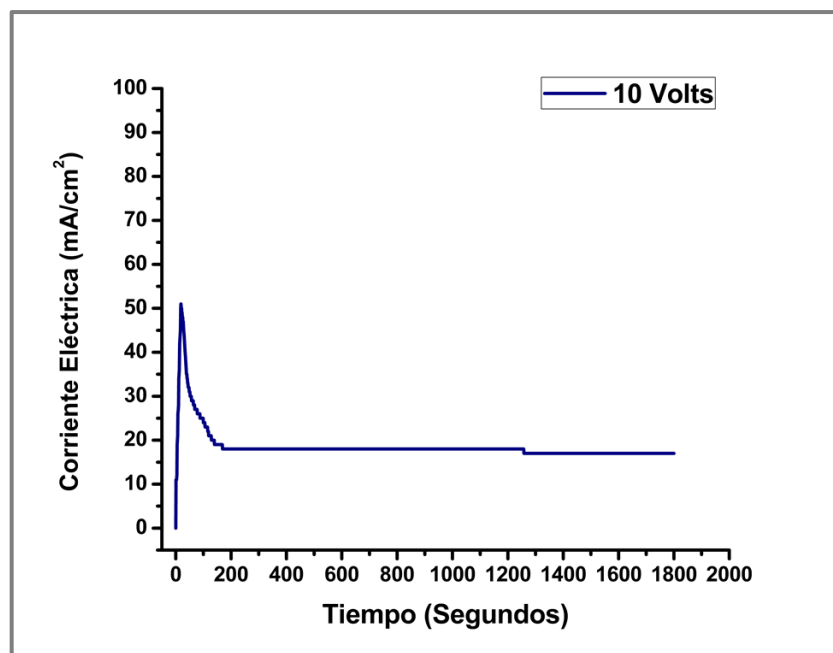


Figura 4.2.- Curva densidad de corriente-tiempo que indica el crecimiento de una capa anódica a 10 Volts en una solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y NH_4F a temperatura ambiente.

En la figura 4.3 se muestra el gráfico de la corriente contra el tiempo de anodizado, ahora a un potencial de 15 V. En este gráfico, en la primera etapa la densidad de la corriente aumenta rápidamente hasta aproximadamente 68 mA/cm², luego cae a un valor constante de 20 mA/cm² durante los primeros 500 segundos, a continuación, tiene una nueva caída de corriente en aproximadamente 19 mA/cm² durante los siguientes segundos, llegando a obtener un valor de corriente de 18 mA/cm² hasta el término de la anodización, después de 1800 segundos.

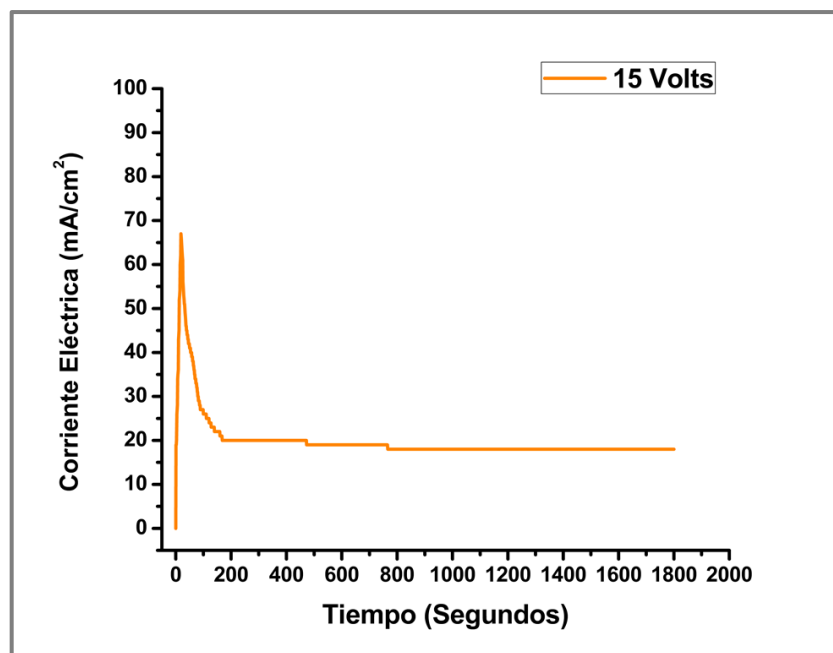


Figura 4.3.- Curva densidad de corriente-tiempo que indica el crecimiento de una capa anódica a 15 Volts en una solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y NH_4F a temperatura ambiente.

En la figura 4.4, el potencial utilizado durante la anodización fue de 20 V. En este caso, la densidad de la corriente aumentó hasta aproximadamente 100 mA/cm², luego cae a un valor constante de 28 mA/cm² aproximadamente durante los primeros 100 segundos de anodizado, posteriormente, tiene una nueva caída progresiva de corriente hasta alcanzar un valor constante de 20 mA/cm² durante los siguientes segundos y hasta el término de la anodización. En general, de las figuras anteriores, se aprecia un pico de densidad de corriente que aumenta a medida que el voltaje aumenta, como se mencionó, esto sucede durante la formación de la capa compacta de óxido, sin embargo, la corriente cae y se estabiliza en aproximadamente 20 mA/cm² para todos los casos. Además del cambio en la densidad de corriente se espera que exista un cambio en la morfología debido al potencial aplicado. Esto será discutido en la próxima sección.

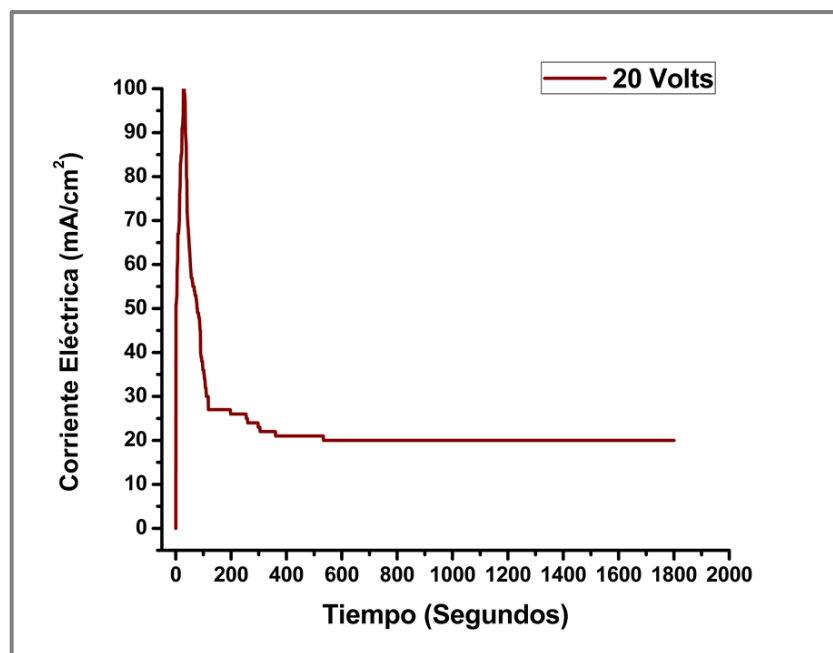


Figura 4.4.- Curva densidad de corriente-tiempo que indica el crecimiento de una capa anódica a 20 Volts en una solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y NH_4F a temperatura ambiente.

4.3 Caracterización de la morfología y composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, mediante Microscopía Electrónica de Barrido

En esta sección se presenta y discuten los resultados de la caracterización morfológica y de la composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn. Como ya se mencionó, el crecimiento de las capas de nanotubos sobre la superficie de la aleación se llevó a cabo mediante en un barrido potencial con voltajes constantes de 5, 10, 15 y 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente. En la figura 4.5, se muestran micrografías de SEM de la vista superior (a, c) y en sección transversal (b, d) de las capas de nanotubos formadas por anodización a 5 V. En la vista superior de la figura 4.5 (a, c), se puede ver una capa organizada de nanotubos, abiertos y rodeados por un precipitado de óxido producto de la reacción de anodización. Generalmente, en

la etapa inicial de anodización, se forma una capa superficial irregular y se elimina gradualmente a medida que avanza la anodización [7]. Nuestros resultados indican que a una duración de anodización de 30 minutos no se logra eliminar completamente esta capa, lo que supone que sería necesario aumentar el tiempo para eliminar esta capa con el fin de exponer con claridad la estructura nanotubular subyacente. En la sección transversal de la figura 4.5 (b, d) se puede apreciar una estructura similar a una banda irregular en lugar de una morfología de matriz nanotubular. Como lo veremos más adelante en los siguientes anodizados, un aumento en el voltaje de anodización aumenta la longitud del nanotubo, ya que la fuerza motriz para el transporte iónico a través de la capa de óxido en el fondo del poro es aumentada, lo que dará lugar a una migración más rápida de iones y por lo tanto la longitud y diámetro de los nanotubos aumentan [8]. En este anodizado, como la velocidad de formación en el fondo y la velocidad de disolución de la parte superior de los nanotubos son lentas debido al bajo voltaje aplicado, la longitud de los nanotubos es baja.

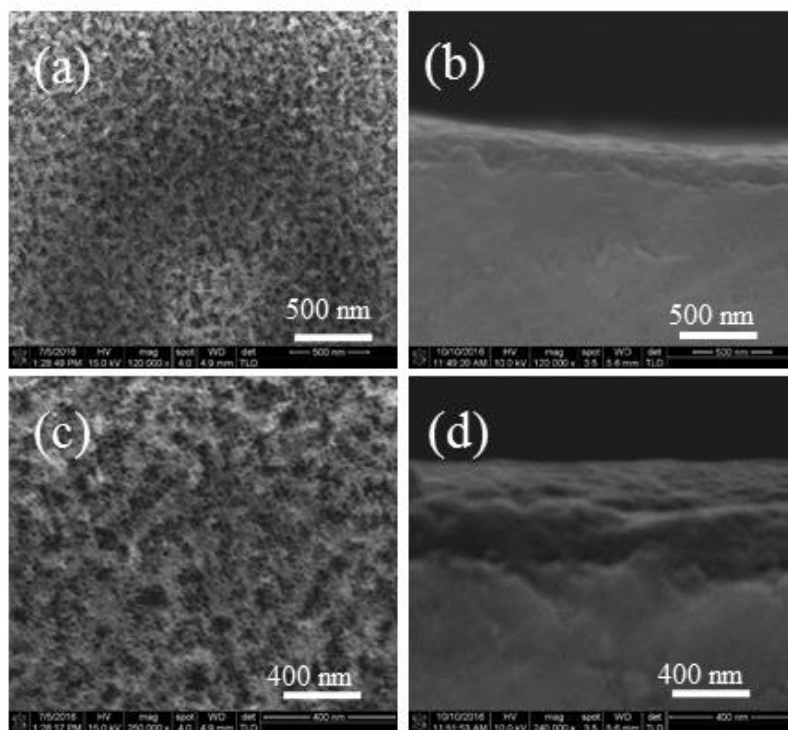


Figura 4.5.- Vista superior (a, c) y sección transversal (b, d) de nanotubos preparados por anodización a 5 Volts durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En la figura 4.6, se muestran micrografías de SEM de la vista superior (a, c) y en sección transversal (b, d) de las capas de nanotubos formadas por anodización a 10 V. En la vista superior de la figura 4.6 (a), se puede ver la distribución general de la capa de crecida de nanotubos sobre la superficie de la aleación. En la figura 4.6 (c), a una mayor magnificación se pueden observar con mayor claridad los nanotubos abiertos con una variedad diámetros y de longitudes. Por otra parte, en la sección transversal de la figura 4.6 (b, d) se puede visualizar claramente que se produce una capa ordenada de nanotubos altamente empaquetados con distintas dimensiones. La capa nanotubular obtenida bajo estas condiciones de anodizado posee una morfología rugosa y lineal. Como se puede observar, la estructura y morfología de las capas de nanotubos puede ser alterada por los parámetros electroquímicos [9]. En este caso, la variación en el voltaje de anodización, con respecto al anterior, provoca un aumento en las dimensiones y configuración de los nanotubos.

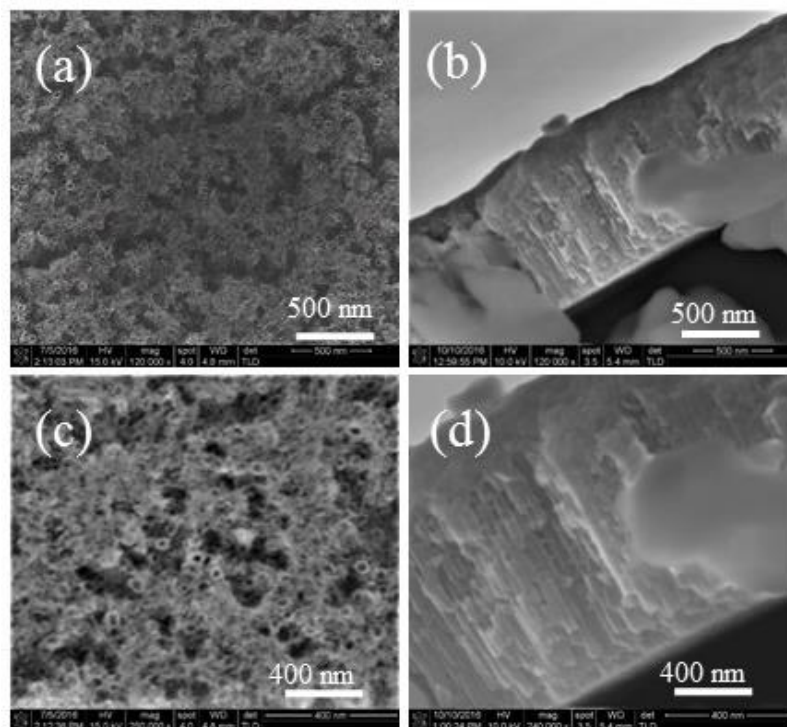


Figura 4.6.- Vista superior (a, c) y sección transversal (b, d) de nanotubos preparados por anodización a 10 Volts durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En la figura 4.7, se muestran micrografías de SEM de la vista superior (a, c) y en sección transversal (b, d) de las capas de nanotubos formadas por anodización a 15 V. En la vista superior de la figura 4.7 (a), se pueden ver una capa organizada de nanotubos con diámetros claramente similares, abiertos y rodeados por una capa de óxido producto de la reacción de anodización. En la figura 4.7 (c), a una mayor magnificación, se logra apreciar que los nanotubos de mayor longitud están rodeados por nanotubos de menor longitud. En la sección transversal de la figura 4.7 (b, d) se puede observar, el crecimiento de una capa nanotubular poco diferenciada pero compacta, las paredes laterales de los nanotubos poseen una superficie rugosa y una configuración lineal. Por otra parte, en la figura 4.7 (b) se observa la formación de poros sobre la superficie de la aleación, indicado con una flecha, relacionado al agrietamiento de forma localizada de la capa de óxido por efecto de la disolución química del óxido provocado por los iones fluoruros empleado en el anodizado [10].

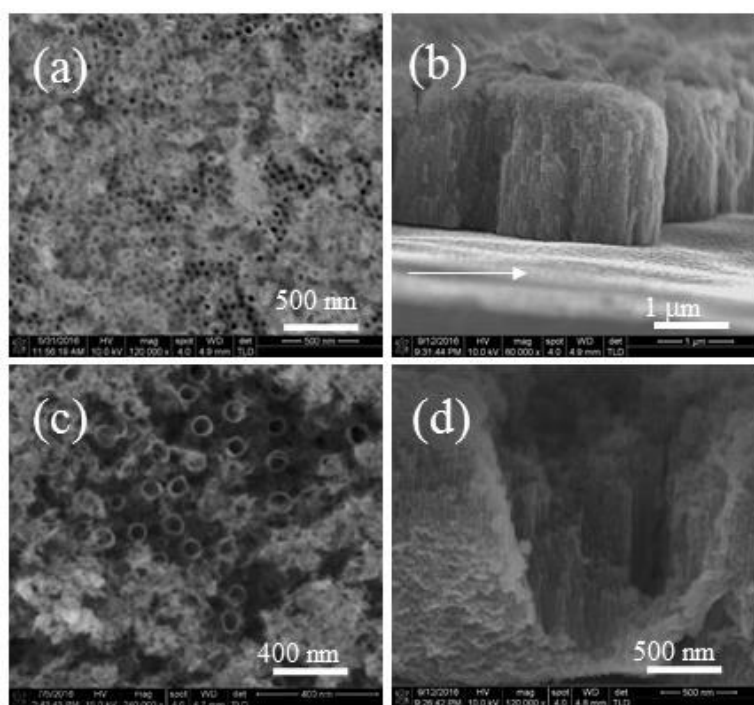


Figura 4.7.- Vista superior (a, c) y sección transversal (b, d) de nanotubos preparados por anodización a 15 Volts durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En la figura 4.8, se muestran micrografías de SEM de la vista superior (a, c) y en sección transversal (b, d) de las capas de nanotubos formadas por anodización a 20 V. En la vista superior de la figura 4.8 (a, c), de manera similar a la figura anterior, se observan capas auto-organizadas que consisten en matrices nanotubulares con diámetros diferentes, donde los nanotubos grandes están rodeados por varios tubos pequeños, esta característica de auto-organización con diámetros diferentes también es evidente desde la vista transversal. Asimismo, se observa que la superficie de la aleación está ligeramente cubierta por precipitados o productos de reacción intermedios presumiblemente de óxidos de titanio (Ti). En la vista en sección transversal de la figura 4.8 (b, d) se puede observar claramente que se produce una capa altamente ordenada que consiste en nanotubos densamente empaquetados con una parte superior abierta y un fondo cerrado. La capa nanoestructurada obtenida por este anodizado, posee una superficie rugosa y una morfología recta; además, en la figura 4.8 (d) se observan unas ondulaciones en las paredes laterales de los nanotubos que son atribuidas a las inestabilidades durante el crecimiento de los tubos [11].

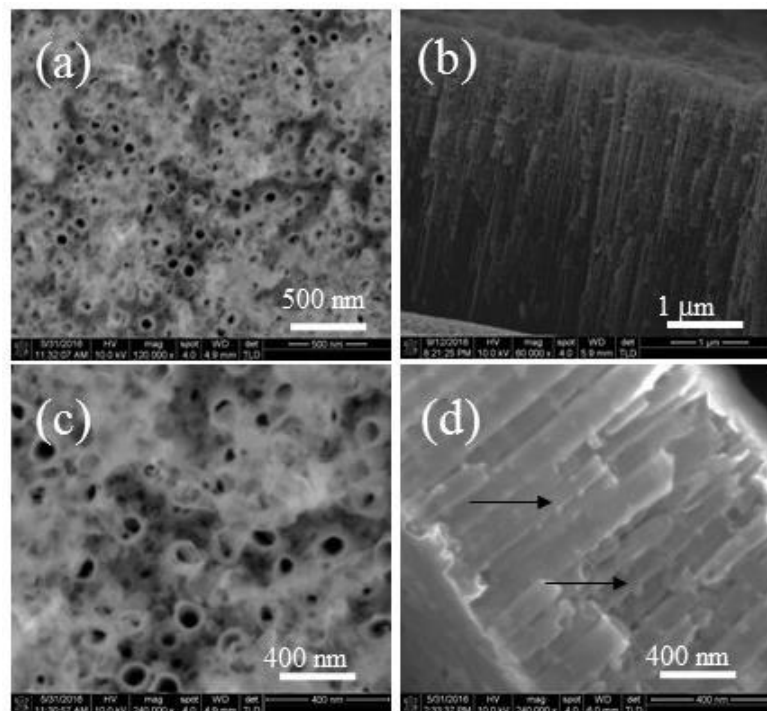


Figura 4.8.- Vista superior (a, c) y sección transversal (b, d) de nanotubos preparados por anodización a 20 Volts durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se muestra el diámetro y longitud promedio obtenido de los nanotubos crecidos sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización (figura 4.9).

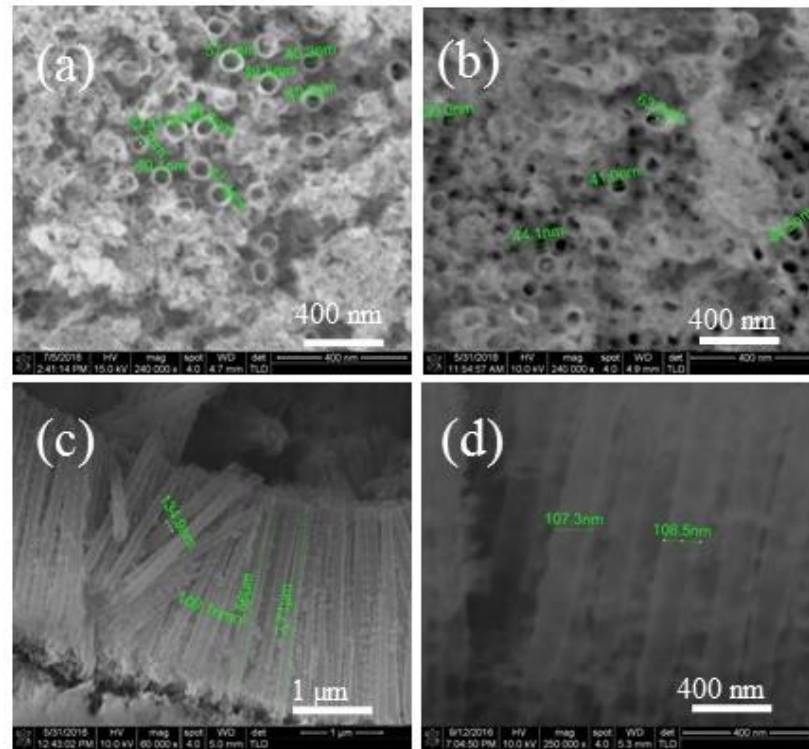


Figura 4.9.- Imágenes representativas del análisis realizado para la obtención del diámetro y longitud promedio de los nanotubos crecidos sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización, (a,b) vista superior y (c,d) sección transversal.

Tabla I:
Resumen del diámetro y longitud promedio de los nanotubos crecidos sobre la superficie de la aleación a diferentes voltajes de anodización

Aleación	Voltaje de anodización	Diámetro promedio (nm)	Longitud promedio (nm)
Ti-24Zr-10Nb-2Sn	5 V	11.1	120
	10 V	24.5	999
	15 V	50.0	2200
	20 V	74.2	3400

De la tabla anterior, se graficaron los datos para poder apreciar más claramente la dependencia casi lineal del diámetro de los nanotubos (figura 4.10a), en función del potencial de anodización, cuando el voltaje de anodización aumentó de 5 a 20V, durante un periodo de 30 minutos, el diámetro de los nanotubos aumenta casi linealmente de 11.1 a 74.2 nm respectivamente. Así mismo, la longitud de la capa de nanotubos también puede ser controlada por el voltaje aplicado, cuando el voltaje de anodización aumentó de 5 a 20V y las longitudes de los nanotubos aumentaron de 120 a 3,400 nm con este aumento en el voltaje de anodizado. En la figura 4.10 (b) se puede ver la influencia proporcional que tiene este parámetro sobre las dimensiones de los nanotubos. El aumento en las dimensiones de los nanotubos se atribuye a una competencia entre la formación del óxido en la base del nanotubo y la disolución química del óxido en la parte superior por los iones fluoruro presentes en el electrolito empleado, lo que significa que la formación de nanotubos bajo estas condiciones de anodizado está limitada por el potencial aplicado, dado que se ha reportado que la mayor potencial aplicado la velocidad de disolución química es mayor que la de la formación del óxido, lo que implica la formación de estructuras tubulares de mayor longitud [8].

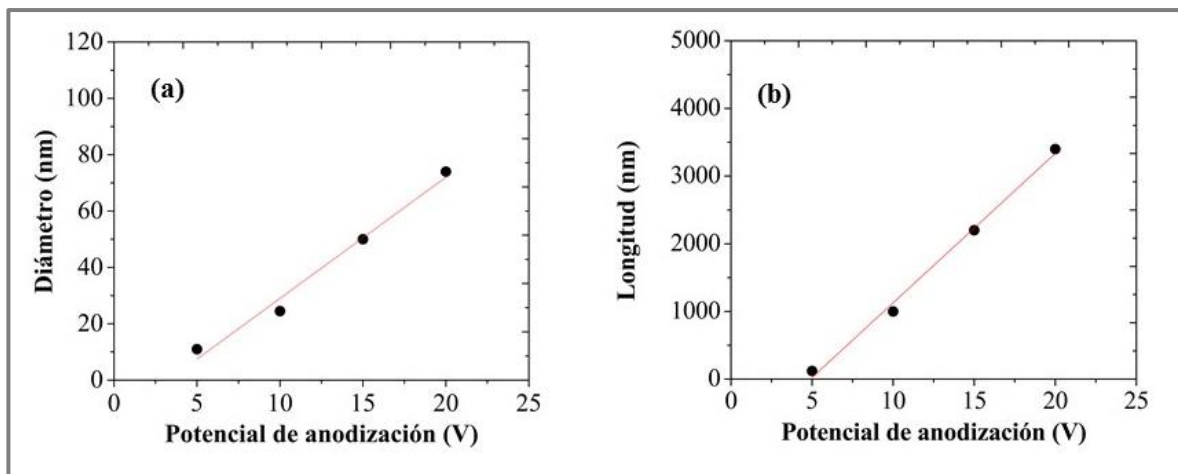


Figura 4.10.- Variación en el diámetro (a) y longitud (b) de los nanotubos crecidos sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn en función del potencial de anodización durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente en este proyecto de investigación se procedió a caracterizar la composición química de las muestras anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn por medio energía dispersiva de Rayos X (EDXS) en el SEM (figura 4.11 y 4.12).

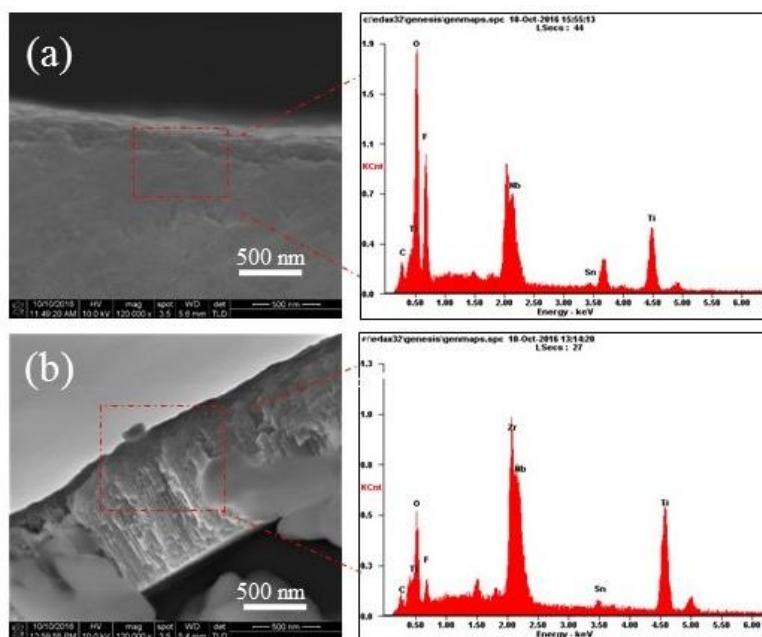


Figura 4.11.- Imágenes representativas del análisis y caracterización de la composición química de las muestras anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn por medio energía dispersiva de Rayos X (EDXS), (a) 5 V y (b) 10V.

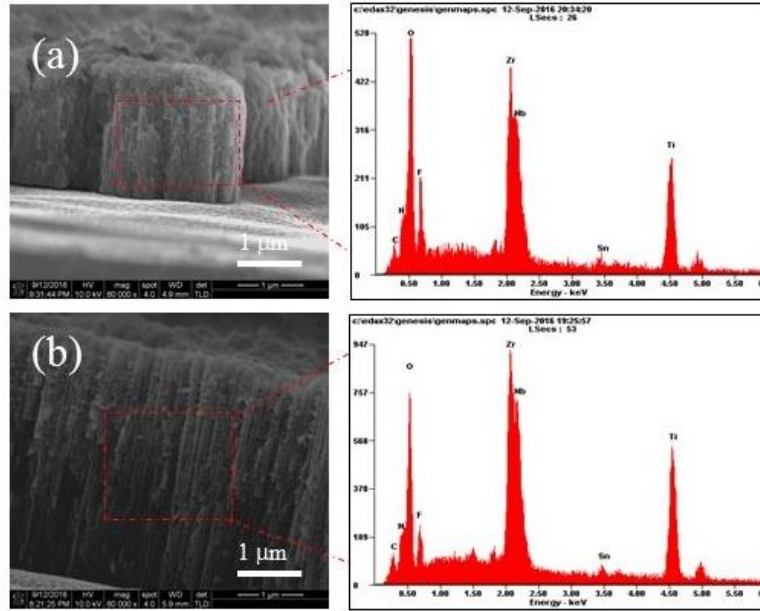


Figura 4.12.- Imágenes representativas del análisis y caracterización de la composición química de las muestras anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn por medio energía dispersiva de Rayos X (EDXS), (a) 15 V y (b) 20V.

Como se puede ver en la tabla II, el análisis realizado en diferentes sitios de las capas anódicas reveló que cada muestra estaba compuesta principalmente de los elementos Ti, Zr, Nb, Sn, O y F. Con la incorporación de los elementos O y F en las muestras anodizadas, los porcentajes de los elementos originales Ti, Zr, Nb y Sn cambiaron. Con el aumento en el porcentaje de O, los porcentajes del elemento Zr en los anodizados de 5 y 15 V fueron menores, en comparación con la aleación, el mismo caso se presenta en el elemento Ti en los anodizados 15 y 20 V, la disminución en el porcentaje de estos elementos puede ser explicado considerando la diferencia en la tasa de disolución por diferentes sistemas de óxidos ya que se ha reportado que la formación de nanotubos en diferentes metales puros tiene diferentes tasas de disolución química en electrolitos con iones fluoruro [12]. La presencia del flúor en las capas anódicas varía entre un 6.67 y un 13.11 at% a partir de la solución electrolítica de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a una concentración de 1 M y NH_4F a una concentración de 0.25 M. Los nanotubos formados a 5 y 10 V contenían entre un 13.03 y 6.62 at% de flúor respectivamente, después de 30 minutos de anodización. La disminución en el

contenido de flúor en el anodizado de 10 V aparentemente se produce debido a la disolución intensa del óxido en las paredes de los nanotubos [13]. Por otra parte, los nanotubos formados a 15 y 20 V contenían entre un 13.11 y 6.67 at% de flúor respectivamente; notablemente, el contenido de flúor en los nanotubos formados a 5 V es similar a los formados a 15 V a pesar de que el espesor es inferior. Dado que la longitud de la parte nanoporosa de la película es aproximadamente la misma en ambos casos, se ha reportado que el flúor se incorpora mayormente en la parte porosa de la película, ya que dependiendo del sitio de análisis y de las condiciones del anodizado el contenido de flúor puede cambiar [14].

El estudio del contenido de flúor en las aleaciones anodizadas es de especial interés, ya que la presencia de este elemento ha sido relacionada con propiedades antibacterianas. Además, se ha reportado que la presencia del flúor no altera la respuesta celular en comparación con aleaciones sin anodizar [13].

Tabla II:
Análisis de la composición elemental (EDXS) de los nanotubos crecidos sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización

Anodizado	Ti (wt%)/ (at%)	Zr (wt%)/ (at%)	Nb (wt%)/ (at%)	Sn (wt%)/ (at%)	O (wt%)/ (at%)	F (wt%)/ (at%)
5 V	40.20/ 24.95	00.93/ 00.30	18.00/ 05.76	03.77/ 00.94	26.25/ 48.78	08.33/ 13.03
10 V	35.22/ 29.16	25.32/ 11.01	15.14/ 06.46	03.76/ 01.25	14.50/ 35.93	03.17/ 06.62
15 V	18.94/ 09.58	15.14/ 04.02	08.87/ 02.31	01.48/ 00.30	38.13/ 57.77	10.28/ 13.11
20 V	30.65/ 20.90	22.46/ 08.64	13.22/ 04.65	02.55/ 00.70	19.12/ 39.03	03.88/ 06.67

(wt%): Porcentaje en peso
(at%): Porcentaje atómico

Una vez caracterizada la morfología y composición de los nanotubos se procedió a evaluar la biocompatibilidad de las aleaciones con nanotubos. Primeramente, se evaluó la capacidad de adhesión de las células de cultivo primario a las aleaciones anodizadas mediante microscopia de fluorescencia, los resultados serán comentados en la siguiente sección.

4.4 Estudio de la adhesión de las células de cultivo primario a las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn mediante microscopía de fluorescencia

Para el desarrollo de dispositivos biomédicos, la naturaleza química y la morfología superficial de los biomateriales son factores determinantes en la biocompatibilidad, ya que la superficie del biomaterial es la primera en entrar en contacto con el tejido vivo cuando este se introduce en el cuerpo [15]. Un factor determinante en el estudio de la biocompatibilidad de materiales empleados como placas dentales es la adhesión celular, la cual hace alusión a la cantidad de células que se pueden adherir a la superficie de un biomaterial [16]. Para iniciar con las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”, en este proyecto de investigación, se estudió la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] y los controles Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar, TiNi y células libres mediante microscopía de fluorescencia. En la figura 4.13, se muestran las imágenes de fluorescencia de las células de cultivo primario sobre los controles empleados mediante la tinción de los núcleos con DAPI. En la figura 4.13 (a,b) se observan las células libres crecidas en placas de cultivo celular, estas placas están fabricadas de una superficie de poliestireno hidrófilo, que mejora la adherencia celular [17], por lo cual se logra observar una gran cantidad de núcleos de células adheridas por campo. Esta tendencia también es observada en la figura 4.12 (c,d), que corresponde al control de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, en donde se puede apreciar una gran cantidad de núcleos teñidos, cada uno correspondiente a una

célula adherida a la superficie de la aleación. En el en el caso del control correspondiente a la aleación titanio-níquel (TiNi) figura 4.13 (e,f), se puede ver una disminución en la cantidad de núcleos, lo que indica que se fijaron pocas células sobre la superficie de esta aleación; como ya se mencionó, esto puede deberse a la corrosión de la aleación cuando entra en contacto con el medio de cultivo, lo que provoca un efecto adverso en la viabilidad celular [18, 19].

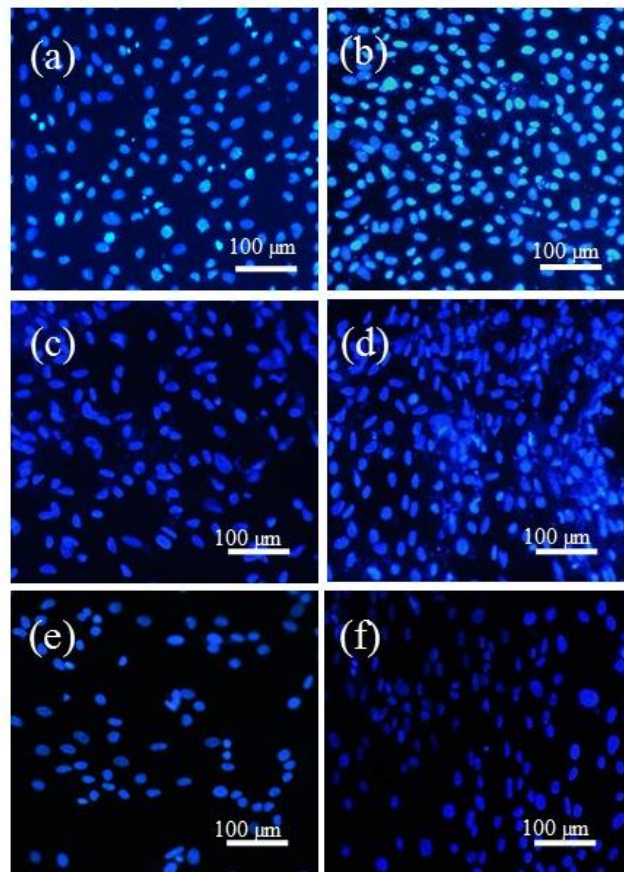


Figura 4.13.- Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de cultivo celular primario mediante la tinción de los núcleos con el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) después de 72 horas de incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Células libres de aleación (a, b), control Ti-24Zr-10Nb-2Sn (c,d) y TiNi (e,f)

En la figura 4.14, se muestran las imágenes de fluorescencia de las células de cultivo primario sobre las aleaciones anodizadas de 5 y 10 V mediante la tinción de los núcleos con DAPI. En la figura 4.14 (a,b) se muestran los núcleos teñidos de células adheridas sobre la superficie del anodizado a 5 V, se puede

ver gran cantidad de núcleos teñidos, sin embargo, se observó un mayor índice de adhesión celular en la figura 4.14 (c,d), que pertenece al anodizado de 10 V. Como ya lo vimos en la sección de caracterización, la superficie activa de estos anodizados tiene un tamaño nanométrico, lo cual puede favorecer la adhesión celular, ya que se ha reportado que los componentes celulares que están en el rango nanométrico se pueden fijar fácilmente a este tipo de superficies [20].

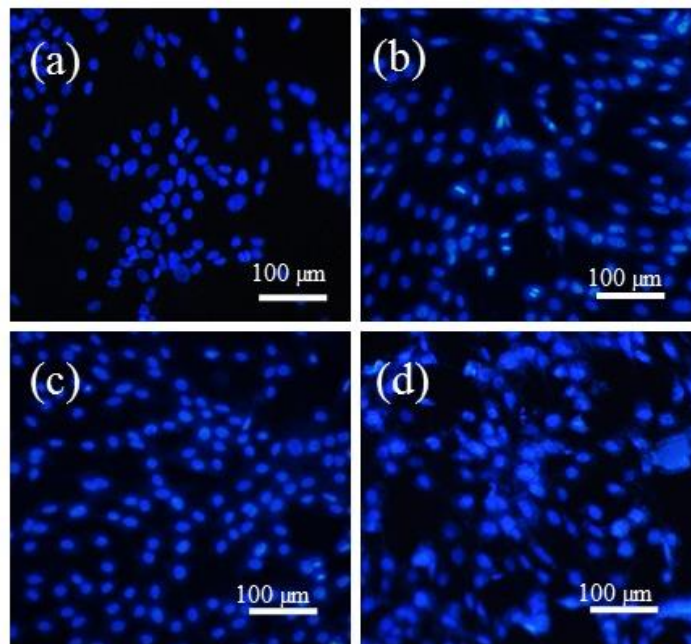


Figura 4.14.- Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de cultivo celular primario mediante la tinción de los núcleos con el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) después de 72 horas de incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Aleación anodizada a 5 V (a, b) y aleación anodizada a 10 V (c,d)

En la figura 4.15, se muestran las imágenes de fluorescencia de las células de cultivo primario sobre las aleaciones anodizadas de 15 y 20 V mediante la tinción de los núcleos con el marcador fluorescente DAPI. En la figura 4.15 (a,) se puede observar la distribución de los núcleos teñidos a lo largo de la superficie del anodizado a 15 V, mientras que en la figura 4.15 (b) se alcanza a apreciar la morfología celular con extensiones del citoplasma que las células han desarrollado de manera extensa sobre toda la superficie. Por otra parte se

observó una disminución en el índice de adhesión celular en la figura 4.15 (c,d), que pertenece al anodizado de 20 V. Como ya se mencionó, en las pruebas de viabilidad celular, esta disminución podría ser debida a las diferencias de carácter físico-químico, tales como la composición química o diferencias en la estructura del óxido [21].

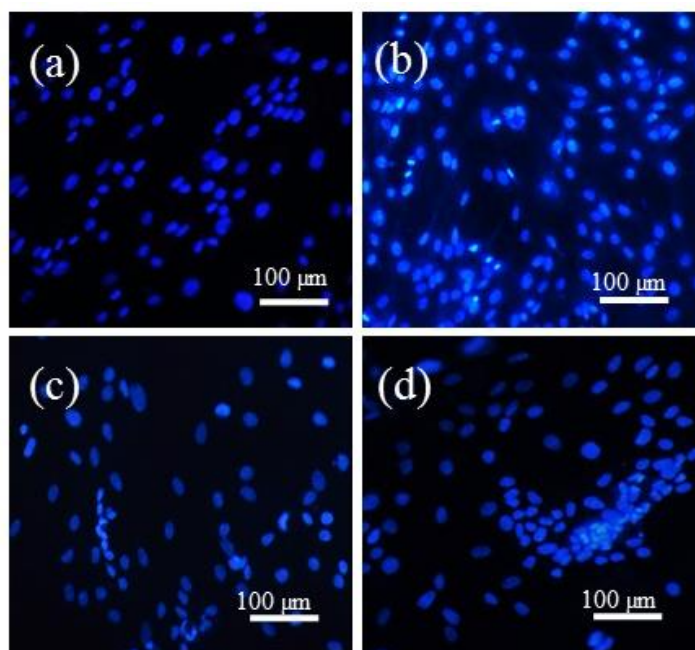


Figura 4.15.- Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de cultivo celular primario mediante la tinción de los núcleos con el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) después de 72 horas de incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Aleación anodizada a 15 V (a, b) y aleación anodizada a 20 V (c,d)

4.5 Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT

La viabilidad celular, se refiere a la capacidad de las células de seguir desarrollando sus funciones metabólicas de manera normal ante la presencia de un biomaterial [16]. Para el desarrollo de dispositivos biomédicos, la composición química y la morfología superficial de los biomateriales son factores determinantes en la biocompatibilidad, ya que la superficie del biomaterial es la primera en entrar en contacto con el tejido vivo cuando este se introduce en el cuerpo [15]. En este proyecto de investigación, se evaluó la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre las células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT, empleado para cuantificar la viabilidad celular. El MTT amarillo es reducido a formazán púrpura cuando hay actividad mitocondrial, por lo que, el formazán que se produzca dentro de las muestras es directamente proporcional a las células vivas [22]. El ensayo realizado, está representado en la figura 4.16.

Las células empleadas en este bioensayo fueron caracterizadas mediante la tinción de fosfatasa alcalina, después de 72 horas de cultivo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, ácido ascórbico (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL), dexametasona (100 nM) y β -glicerofosfato (10 mM). Se logró observar la presencia de células teñidas de coloración roja lo que indicaba la presencia de células osteoblásticas, esto significa que las células no presentaron desdiferenciación, lo que sugiere que los materiales evaluados permiten a las células conservar sus características propias después de 72 horas de cultivo (figura 4.17).

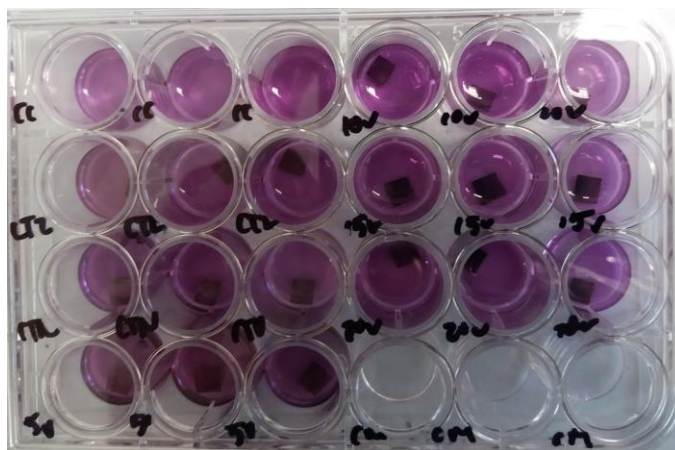


Figura 4.16.- Ensayo colorimétrico MTT de aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre las células de cultivo primario

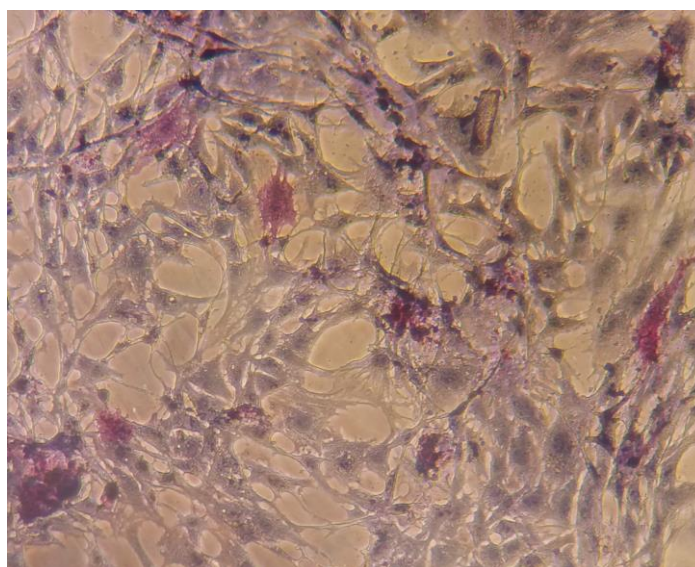


Figura 4.17.- Caracterización de osteoblastos mediante la tinción de fosfatasa alcalina

En la figura 4.18, se encuentran graficados los valores de absorbancia obtenidos por el ensayo colorimétrico de MTT, al evaluar las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] sobre células de cultivo primario.

Los resultados obtenidos indican que el control de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar, no presentó citotoxicidad aparente, dando posiblemente a la formación de una capa de óxido que naturalmente se forma sobre las superficies de las aleaciones de titanio [23], sin embargo, se puede

observar una disminución en la viabilidad celular en el control de TiNi, esta disminución podría deberse a la liberación de iones Ni al medio de cultivo, lo que podría provocar un efecto negativo en la viabilidad celular [24].

Por otra parte, es posible observar una similitud entre la viabilidad celular de la muestra control (células libres de aleación) y la aleación anodizada a 5V, en el cual existe una mayor viabilidad en los cultivos celulares, en comparación con los anodizados de 10, 15 y 20 V en donde se observa una disminución en la viabilidad celular a medida que se modifica la superficie. Se puede observar que a partir de la aleación de 10 V no se observan cambios en la viabilidad celular, lo que podría indicar que las estructuras nanométricas obtenidas entre 10 y 20 V no generan una citotoxicidad mayor, aunque en la caracterización por microscopía electrónica de barrido se observan cambios estructurales relevantes. Los parámetros que influyen en la interacción de las células con superficies nanoestructuradas incluyen la topografía superficial, la energía superficial y la adsorción de proteínas, así como su conformación y formación de puntos de adhesión. Se ha informado que un aumento en el área superficial observada en las superficies nanoestructuradas aumenta la cantidad de proteínas adsorbidas en la superficie, lo que a su vez influye en la adhesión y la proliferación celular [25-27]. La disminución en la viabilidad celular por parte de los anodizados podría ser debida a las diferencias de carácter físico-químico, tales como la composición química o diferencias en la estructura del óxido [21]. Se ha reportado, además, que el tamaño, forma, espaciamiento y desorden de las nanoestructuras tienen gran influencia en el comportamiento celular [28, 29].

Los resultados presentados en este bioensayo fueron obtenidos por triplicado, los datos se presentan como la media del porcentaje de citotoxicidad y la desviación estándar de la media.

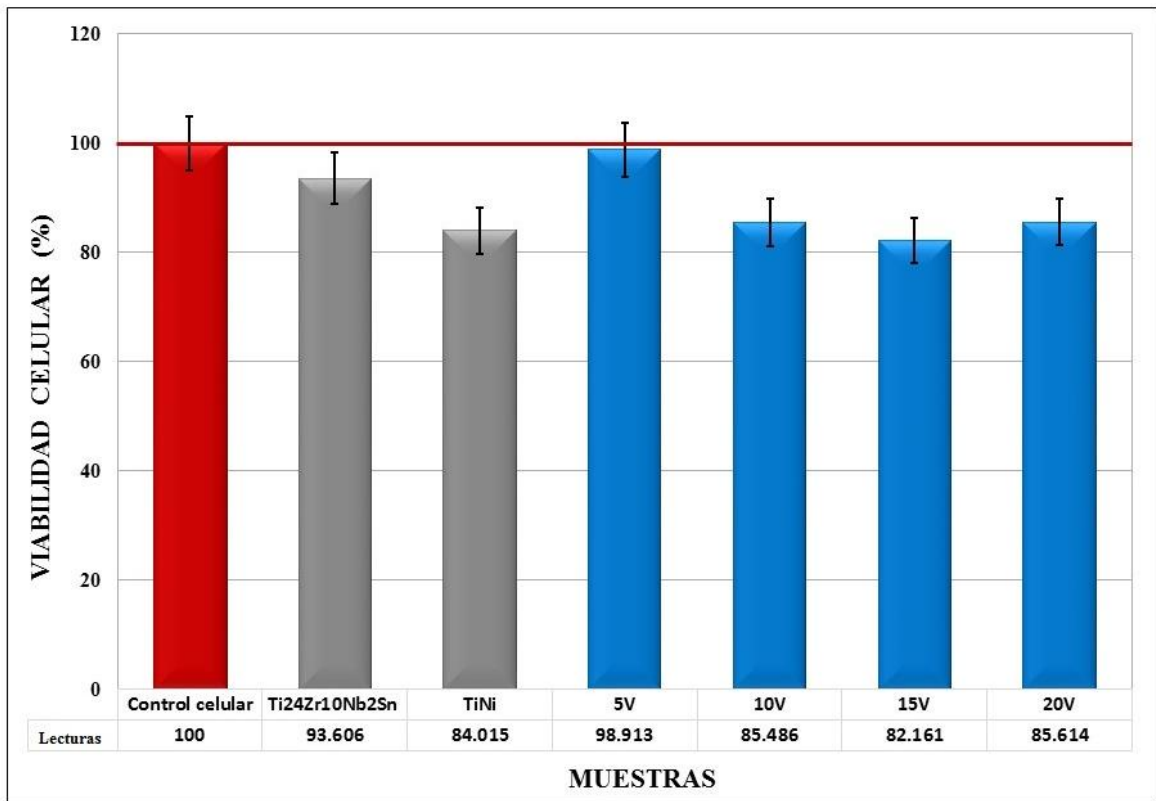


Figura 4.18.- Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre las células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT

En la figura 4.19, se encuentran graficados los valores porcentuales de viabilidad y citotoxicidad de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre las células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT. El mayor porcentaje de viabilidad obtenido, fue para el anodizado de 5 V con un 99%, seguido del control de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar con un 94%. Por su parte, se observa un 84% de viabilidad celular para el control de la aleación TiNi, mientras que, para los anodizados de 10, 15 y 20 V se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 85, 82 y 86% respectivamente, cabe resaltar que el anodizado de 15 V fue el que mayor citotoxicidad presentó con un 18%.

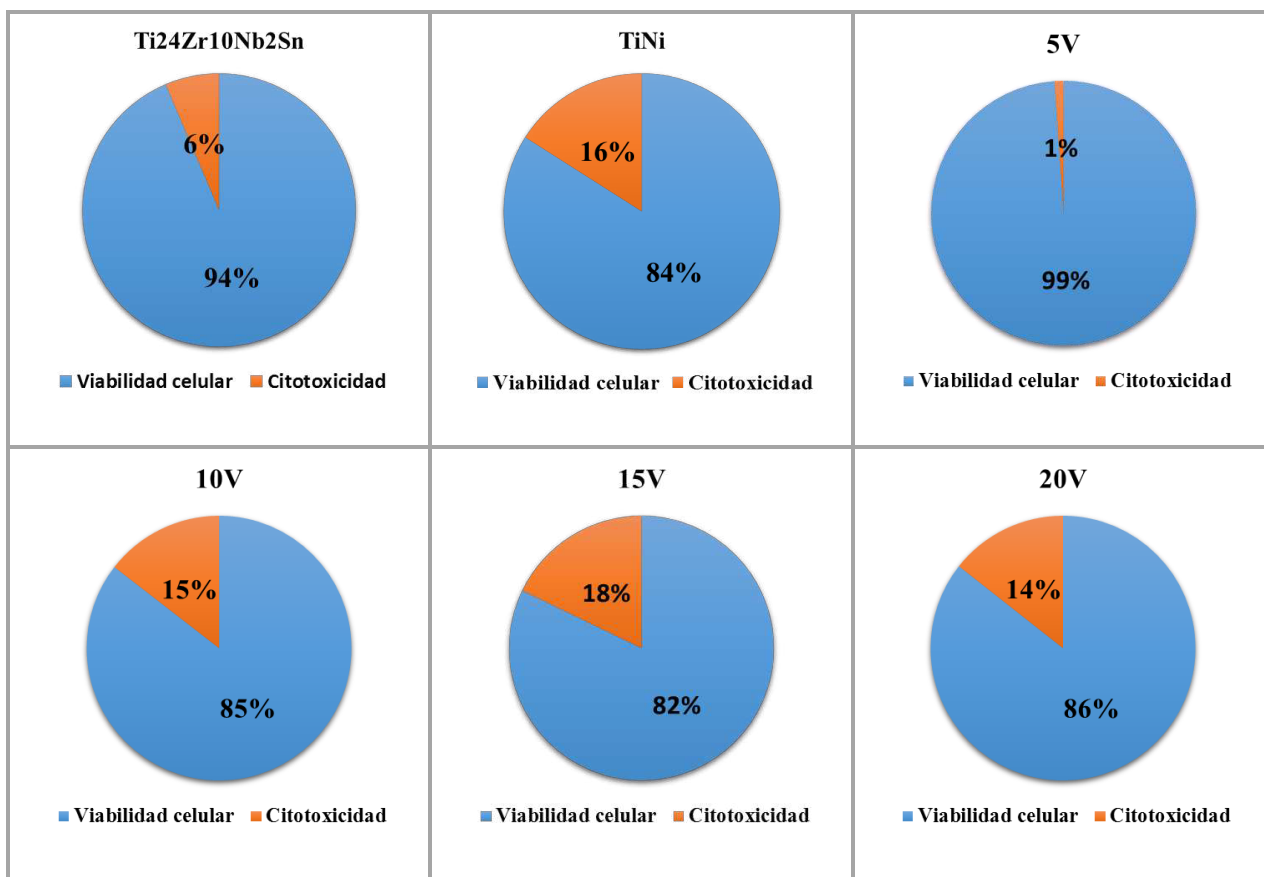


Figura 4.19. Determinación del porcentaje de viabilidad celular y citotoxicidad de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre las células de cultivo primario mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

4.6 Estudio de la liberación “*in vitro*” del fármaco gentamicina a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn

En los últimos años, las estructuras nanotubulares generadas en la superficie de las aleaciones de base Ti han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación de fármacos. Algunos factores para mejorar el rendimiento de los sistemas de liberación de fármacos en las superficies nanoestructuradas son el tamaño, la morfología y la uniformidad de las nanoestructuras de TiO₂, para controlar estos factores se emplean diversas técnicas entre las que se encuentra la anodización electroquímica [30-32]. Como vimos en los resultados presentados al principio del capítulo, estos parámetros pueden ser controlados mediante el potencial aplicado. En este proyecto, se estudiaron los perfiles de liberación del fármaco gentamicina al 1% (p/v) en agua para la aleación anodizada de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts]

En la figura 4.20, se encuentran graficados los perfiles de liberación para la aleación anodizada a 5 V. Se puede observar que el proceso de liberación consta de dos etapas, una liberación inicial “ráfaga” (línea punteada) durante los primeros 60 minutos y una liberación constante, hasta llegar a las 24 horas de liberación [31-33].

El efecto de liberación inicial “ráfaga” se puede atribuir a la liberación de moléculas de fármaco que están adsorbidas sobre la superficie de los nanotubos. Esta etapa de liberación es muy rápida debido al alto gradiente de concentración entre los nanotubos y el medio circundante [34]. La cantidad de liberación de fármaco durante esa etapa debería ser lo suficientemente alta como para prevenir, por ejemplo, infecciones bacterianas en cirugías ortopédicas [31, 35]. Durante la segunda etapa, el fármaco se libera lentamente, esto debido a que las moléculas del fármaco difunden hacia el medio (PBS) desde el fondo de los nanotubos [31, 33].

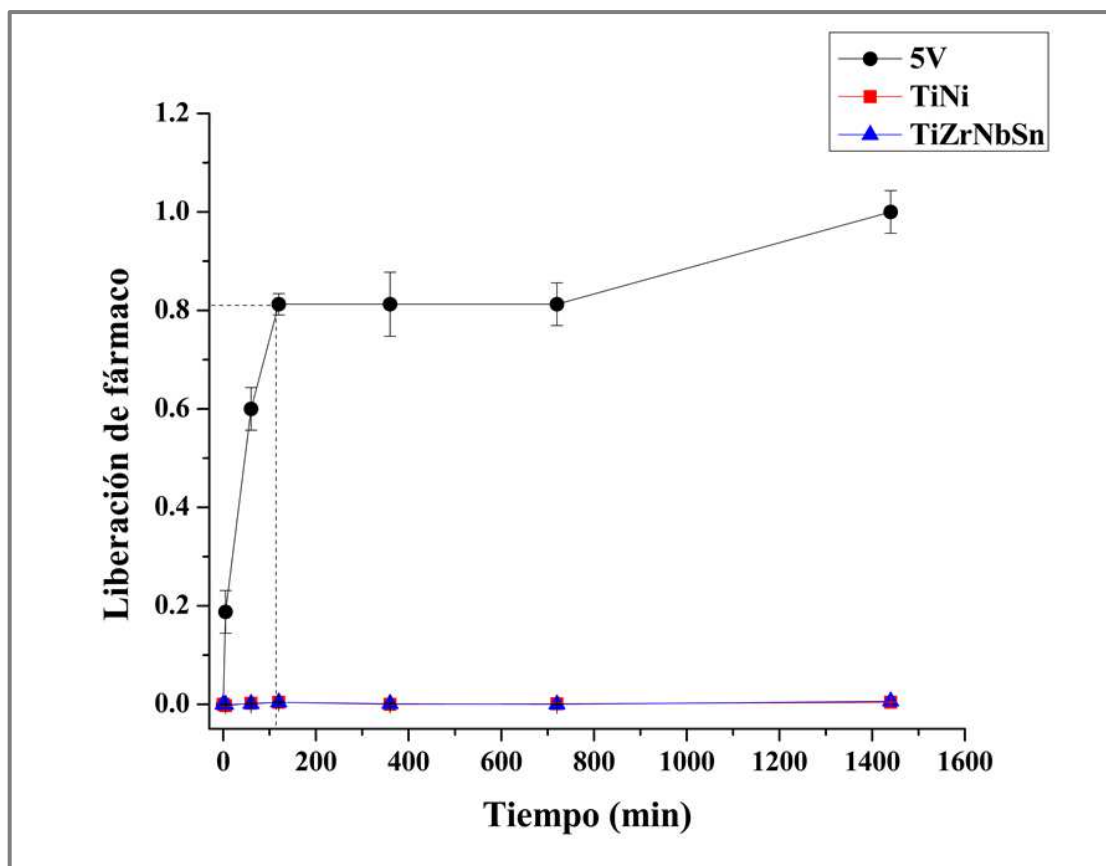


Figura 4.20. Perfil de liberación “*in vitro*” del fármaco gentamicina a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 5 V

En la figura 4.21, se encuentran graficados los perfiles de liberación para la aleación anodizada a 10 V. En este caso, igualmente se puede observar que el proceso de liberación consta de dos etapas, una liberación inicial “ráfaga” durante los primeros 60 minutos y una liberación lenta y linealmente constante hasta llegar a las 24 horas de liberación. Se ha reportado que las características de los nanotubos no sólo tienen un impacto en la cantidad de fármaco cargado dentro de los tubos, sino también en el proceso de liberación. Si los nanotubos son más largos y tienen un diámetro mayor, se puede cargar una mayor cantidad del fármaco y en consecuencia una mayor liberación [36, 37].

Como ya se mencionó en la sección de caracterización, los nanotubos fabricados a 10 V tienen mayor longitud y diámetro que los nanotubos obtenidos a 5 V, esto coincide con lo citado anteriormente ya que se puede observar en la figura 4.20, que la cantidad de fármaco liberado en la etapa inicial “ráfaga” (línea punteada), es muy cercano a la cantidad máxima de fármaco liberado. Por su parte en la figura 4.21, se puede ver que la cantidad de fármaco liberado en la etapa inicial es menor y el tiempo en llegar al máximo de liberación es mayor en comparación con el anodizado anterior lo que significa que las dimensiones de los nanotubos tienen una gran influencia en la cantidad total de carga y liberación del fármaco.

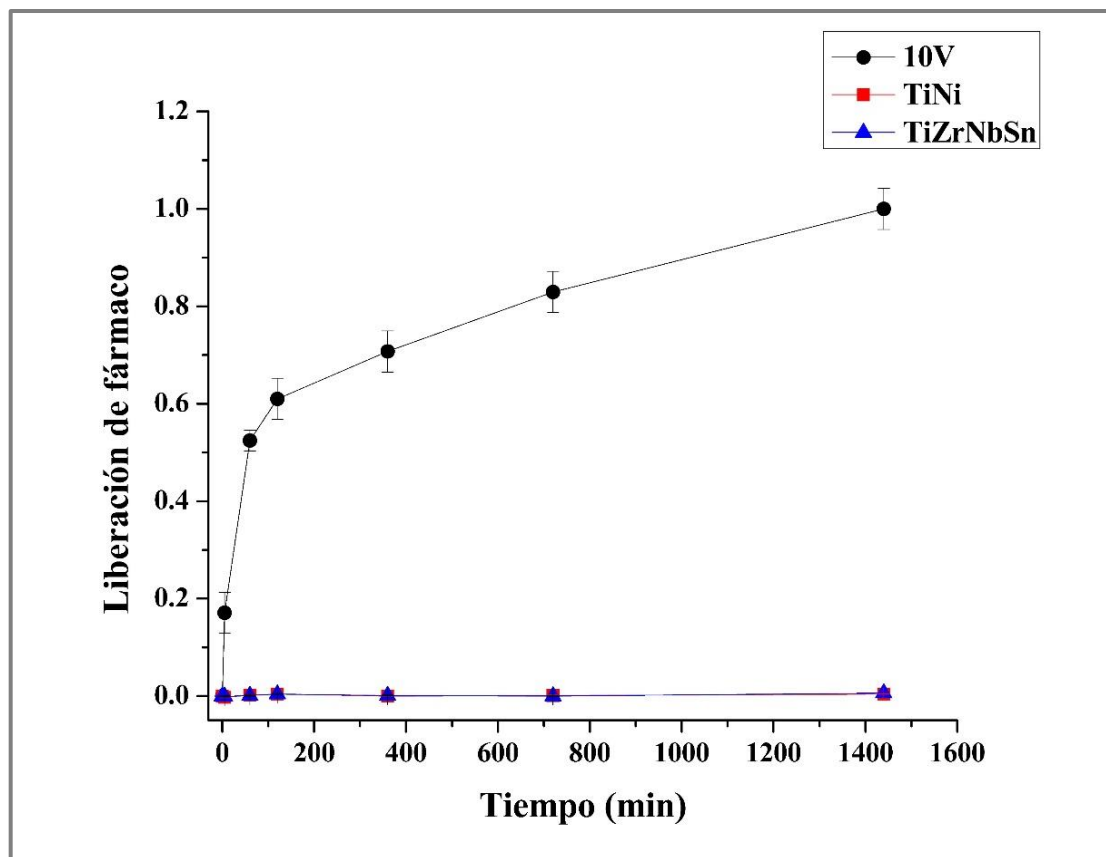


Figura 4.21.- Perfil de liberación “*in vitro*” del fármaco gentamicina a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 10 V

En la figura 4.22, se encuentran graficados los perfiles de liberación para la aleación anodizada a 15 V. Los resultados muestran una liberación “ráfaga” durante los primeros 60 minutos, seguido de una liberación lenta del resto del fármaco. Para las estructuras nanotubulares a 20 V graficados en la figura 4.23, se observó una liberación más lenta, ya que la cantidad de fármaco liberado en la etapa inicial es menor en comparación con el anodizado a 15 V, probablemente debido a las diferencias en las dimensiones de los nanotubos, ya que entre más grandes sean las dimensiones de los nanotubos fabricados, mayor será la reducción en la cantidad del fármaco de liberación durante el efecto de la liberación inicial “ráfaga” [38]. Sin embargo, independientemente de la forma y longitud de las nanoestructuras obtenidas, la cinética de liberación de la gentamicina es muy similar entre ambos anodizados.

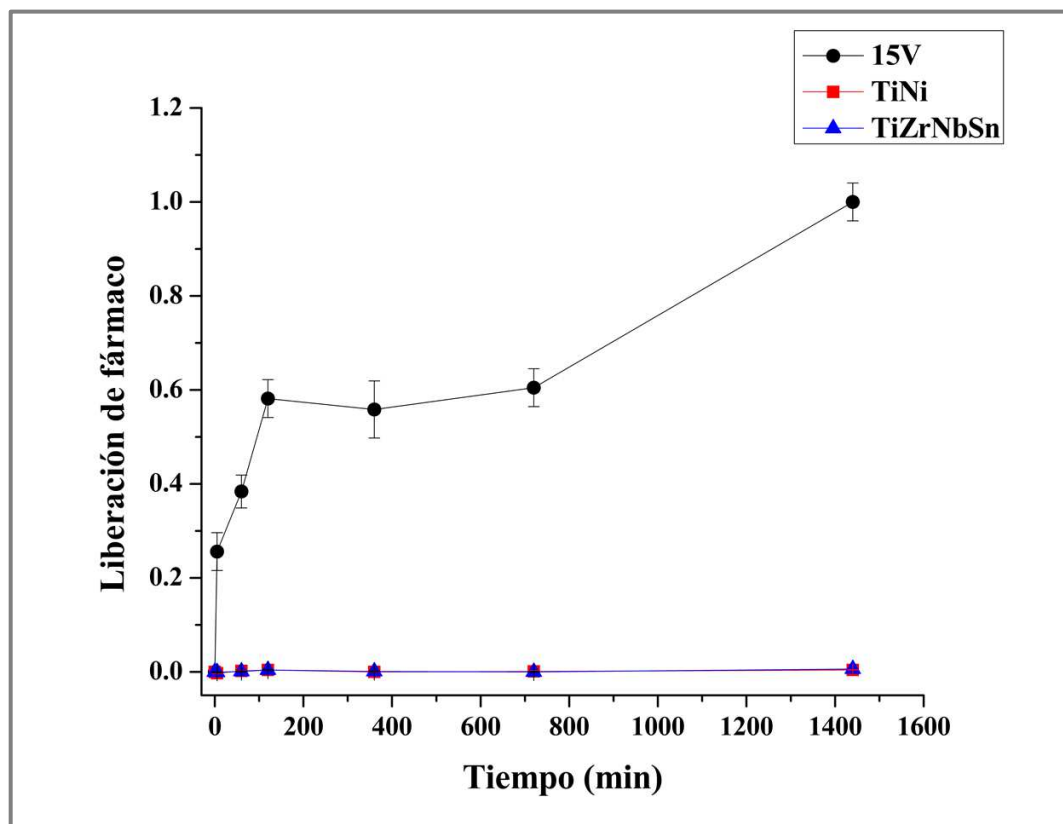


Figura 4.22.- Perfil de liberación “*in vitro*” del fármaco gentamicina a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 15 V

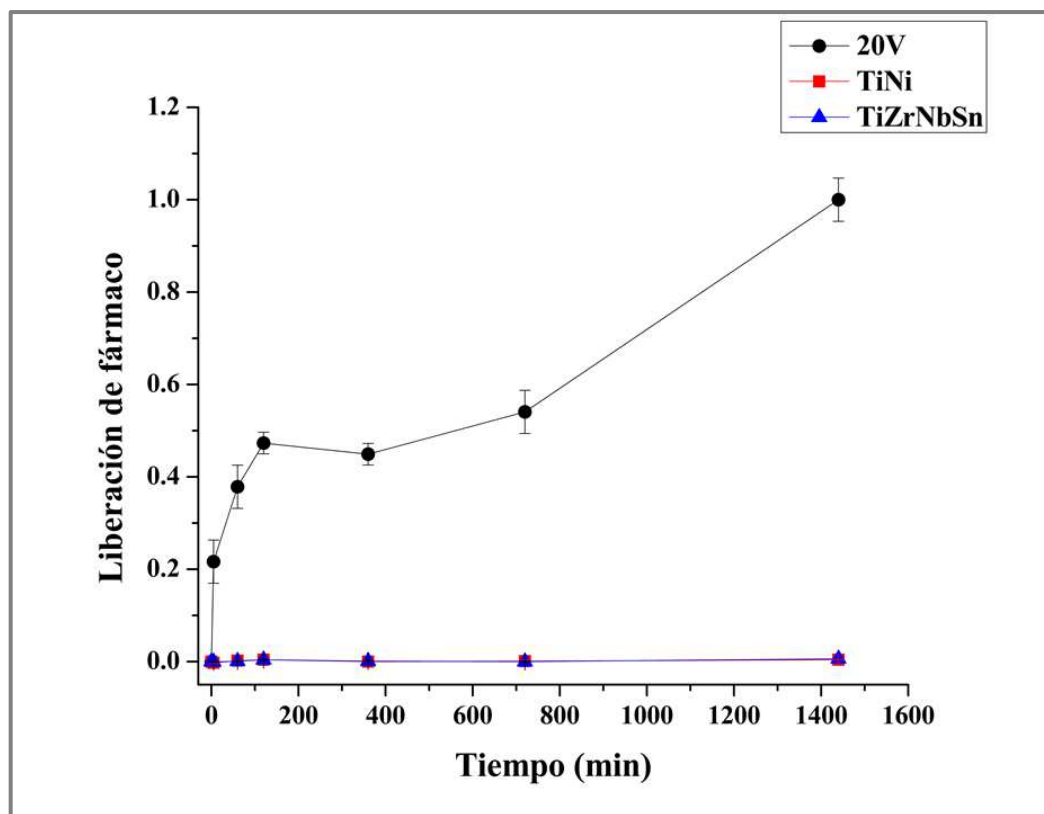


Figura 4.23.- Perfil de liberación “*in vitro*” del fármaco gentamicina a partir de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 20 V

4.7 Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método del antibiograma

Las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de base Ti, han sido estudiadas recientemente [39-41]. El uso de materiales nanoestructurados para aplicaciones en cirugía ortopédica constituye un gran avance en la medicina. Sin embargo, la competencia entre células y bacterias por la colonización superficial de las placas dentales puede provocar problemas de infecciones en los pacientes. Las complicaciones causadas por la terapia antibiótica y el limitado control de los sistemas antibacterianos, conlleva a la búsqueda de nuevas formas de tratamiento, la terapia localizada mediante la liberación de fármaco en las aleaciones anodizadas podría constituir una alternativa para el manejo de

infecciones presentes durante la implantación quirúrgica. En esta investigación, se determinaron las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] cargados y no cargados con el antibiótico gentamicina sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*.

En la figura 4.24, se encuentran representados, los resultados obtenidos por método de antibiograma, en la figura 4.24 (a) se muestra el control de *S. aureus*, el cual representa la viabilidad de la bacteria, en la figura 4.24 (b) se encuentra el control del fármaco gentamicina, en este caso, se utilizó un disco de papel filtro impregnado con el antibiótico a una concentración de (160 mg/ 16 mL), se puede observar el halo de inhibición, que indica la difusión del antibiótico al medio, lo que establece un gradiente de concentración alrededor del disco de papel filtro [42]. En la figura 4.24 (c), se muestran los controles de las aleaciones, en la parte superior se observa el disco de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y en la parte inferior el disco de la aleación de TiNi, los resultados indican que ambas aleaciones no presentan inhibición sobre el crecimiento de *S. aureus*, esto en base a que las bacterias tienen la capacidad de crecer sobre toda la superficie de la placa, por lo cual podemos decir que este microorganismo es resistente a la presencia de estos materiales.

En la figura 4.24 (d) están representados los resultados obtenidos para el control (sin carga de antibiótico) de los anodizados de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts], el parte superior de la placa se encuentra el disco del anodizado de 5 V, en la parte inferior el del anodizado a 10 V, en la parte derecha, el disco del anodizado a 15 V, y en la izquierda el de 20 V. Los resultados muestran un pequeño halo de inhibición, que indica una ligera sensibilidad de la bacteria ante la presencia de estos anodizados, como ya se mencionó en la sección de caracterización, la superficie nanoestructurada de estos anodizados contiene trazas de flúor, por lo que la incorporación de estos iones en las superficies de los anodizados proporciona propiedades antibacterianas [41-43].

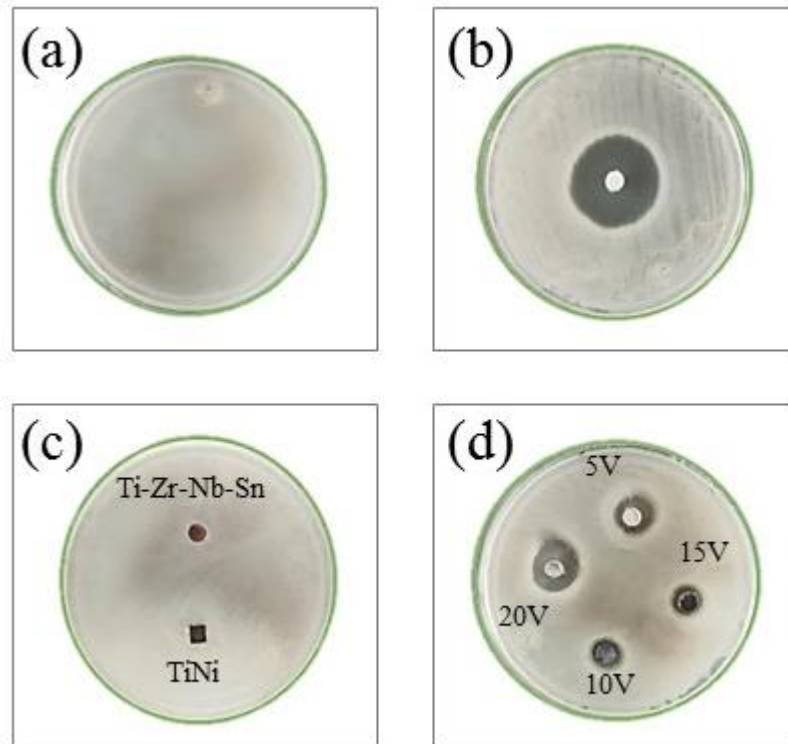


Figura 4.24.- Método del antibiograma: (a) Control *S. aureus*, (b) Control gentamicina, (c) Control aleaciones; arriba Ti-24Zr-10Nb-2Sn, abajo TiNi, (d) Control anodizados; arriba 5V, abajo 10V, derecha 15V, izquierda 20V. Los discos de las aleaciones se colocan sobre la superficie del agar inmediatamente después de haberla sembrado con la cepa de *S. aureus*. Los resultados fueron observados después de 24 horas de incubación.

En la figura 4.25, se muestran los resultados obtenidos por método de antibiograma para cada uno de los anodizados cargados con el fármaco gentamicina, en la figura 4.25 (a) se encuentra el anodizado a 5 V, en la figura 4.25 (b) el anodizado a 10 V, en la figura 4.25 (c) el anodizado de 15 V y por último en la figura 4.25 (d) el disco del anodizado a 20 V. En cada una de las placas se puede observar un amplio halo de inhibición, lo que indica la liberación y la difusión del antibiótico cargado en las aleaciones al medio de cultivo, estableciendo un gradiente de concentración alrededor del disco, por lo que las bacterias no tienen la capacidad de crecer en esta zona donde la concentración del fármaco liberado es lo bastante alta para inhibir su crecimiento.

En base a los valores de referencia y al tamaño de los halos de inhibición (≥ 15 mm), se puede decir que la cepa de *S. aureus* es sensible al fármaco liberado de las aleaciones anodizadas [44].

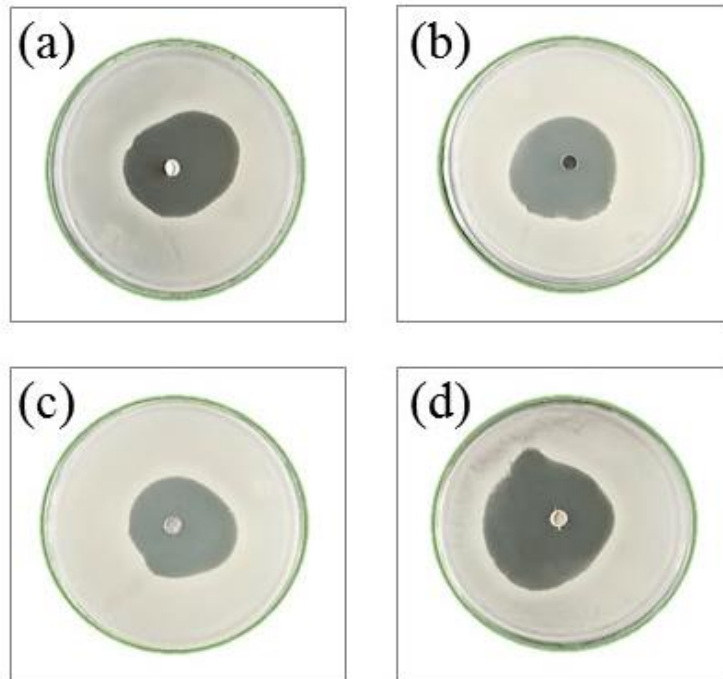


Figura 4.25.- Método del antibiograma: (a) 5 V, (b) 10 V, (c) 15 V, (d) 20 V, los discos de las aleaciones anodizadas cargadas con el fármaco gentamicina se colocan sobre la superficie del agar inmediatamente después de haberla sembrado con la cepa de *S. aureus*. Se observan los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los diferentes discos después de 24 horas de incubación.

4.8 Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de Espectrofotometría

El éxito de biomateriales dentales no solo depende de la oseointegración sino también de la presencia de un entorno estéril alrededor del material implantado [45]. La innegable presencia de microorganismos durante el procedimiento de implantación puede llegar a desencadenar un problema de infección en la zona circundante a la intervención quirúrgica debido a la adherencia de bacterias sobre el material implantado [46, 47].

En este proyecto de investigación, se evaluaron las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, así como las aleaciones cargadas con el fármaco gentamicina sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. En la figura 4.26, se encuentran graficados los valores de absorbancia obtenidos por el método de espectrofotometría al evaluar las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. Se empleó como control positivo de viabilidad bacteriana, un inóculo inicial de 100 µL de la cepa bacteriana y como controles de la aleación se emplearon láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar. En este bioensayo ninguna aleación fue cargada con el antibiótico gentamicina.

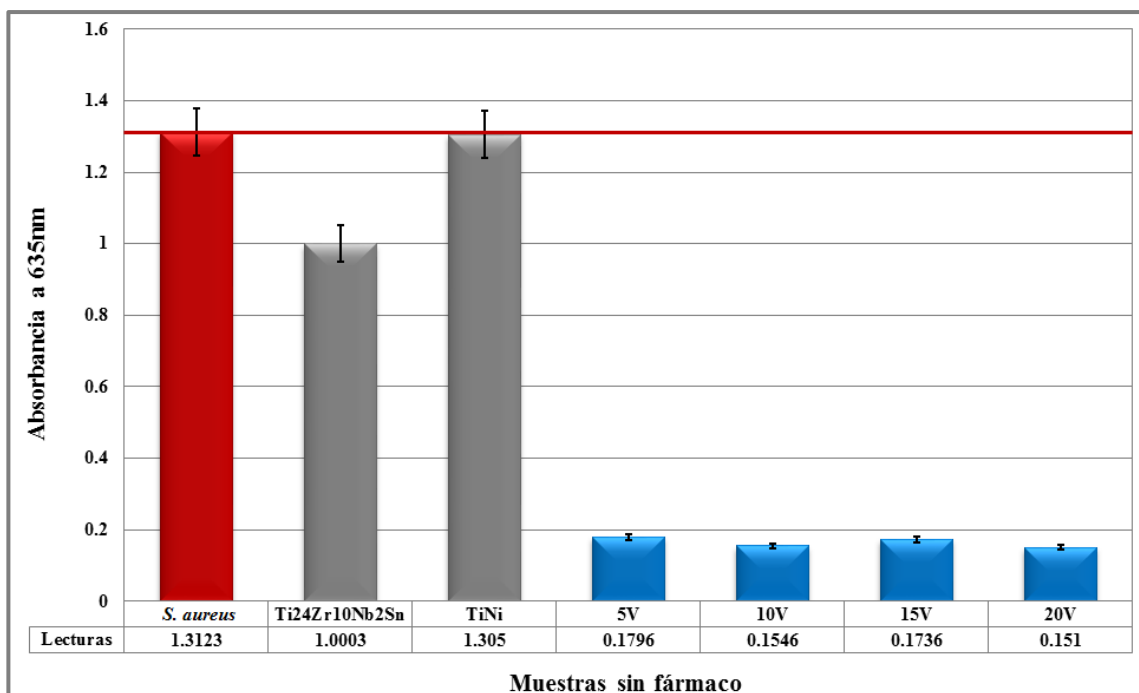


Figura 4.26.- Determinación de la actividad antibacteriana de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de Espectrofotometría.

En este bioensayo, se observa una sensibilidad de la cepa de *S. aureus* a las cuatro aleaciones anodizadas a las que fue evaluada, siendo el anodizado de 20 V el que presentó mayor actividad antibacteriana, con un valor promedio de absorbancia de 0.151, seguido del anodizado a 10 V con un valor de 0.1546 y posteriormente las aleaciones de 5 y 15 V con valores obtenidos de 0.1796 y 0.1736 respectivamente, por lo que se considera que este microorganismo es sensible a la presencia de estas aleaciones anodizadas, esto posiblemente por la presencia del flúor [48, 49].

Por otro lado, la aleación de TiNi, no presentó inhibición sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, con valores de absorbancia similares al control positivo. Por su parte, se observa una sensibilidad de la cepa bacteriana al control de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, mostrando valores de absorbancia por debajo del control positivo. Estos resultados indican que las superficies de las aleaciones con cantidades de flúor incorporado, muestran una disminución significativa en la viabilidad bacteriana en comparación con las aleaciones que no contenían flúor. Los resultados presentados en este bioensayo fueron obtenidos por triplicado,

graficados como medias, con el programa Microsoft Excel 2013. En la figura 4.27, se encuentran graficados los valores de absorbancia obtenidos por el método de espectrofotometría al evaluar las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. Se empleó como control positivo de viabilidad bacteriana, un inóculo inicial de 100 µL de la cepa bacteriana y como controles de la aleación se emplearon láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn. En este bioensayo cada una de las aleaciones fueron cargadas con el antibiótico gentamicina.

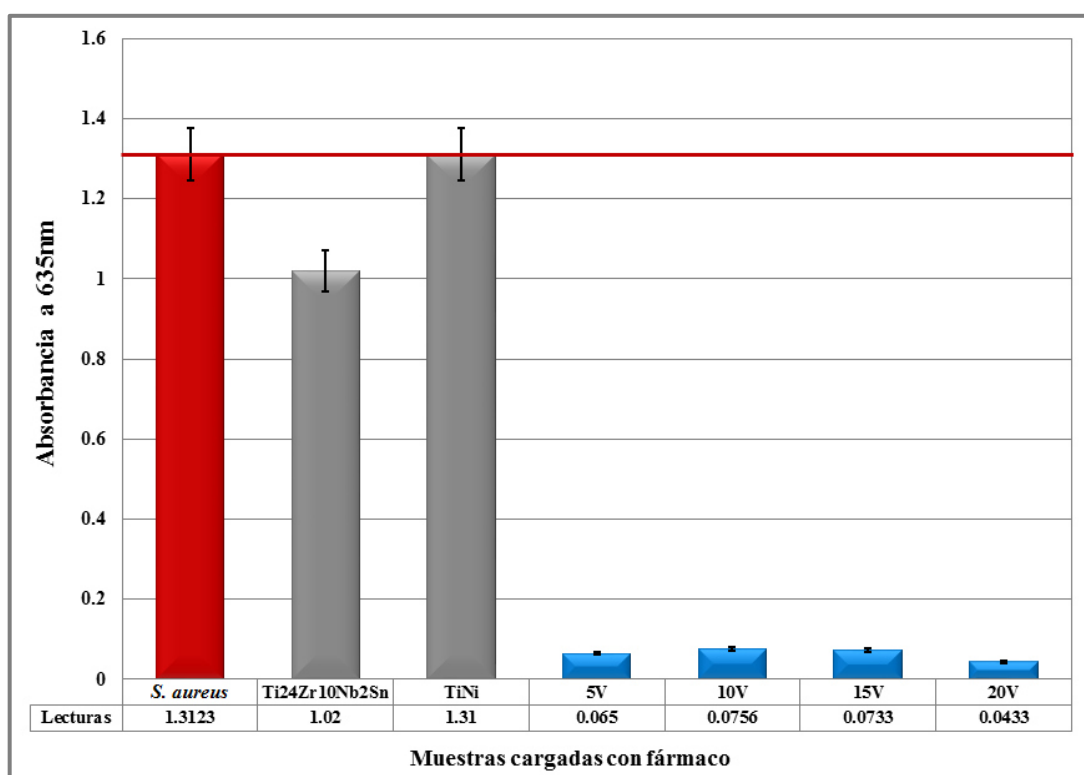


Figura 4.27.- Determinación de la actividad antibacteriana de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de Espectrofotometría.

En este bioensayo, se observa una sensibilidad de la cepa de *S. aureus* a los cuatro anodizados cargados con gentamicina a los que fue evaluado, al igual que en el ensayo anterior el anodizado de 20 V cargado con el fármaco fue el que presentó mayor actividad antibacteriana, con un valor promedio de absorbancia de 0.0433, seguido del anodizado a 5 V con un valor de 0.065 y posteriormente

con valores muy similares, las aleaciones de 10 y 15 V con absorbancias de 0.0756 y 0.0733 respectivamente. En comparación con el ensayo anterior, se observa una disminución significativa en el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, por efecto de la liberación del fármaco gentamicina al medio de cultivo, la gentamicina tiene un efecto bactericida al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la transcripción del DNA bacteriano y, por tanto, la síntesis de proteínas [50]. A su vez las aleaciones empleadas como controles de la aleación TiNi y Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar, mantienen el mismo comportamiento con respecto al ensayo anterior, siendo el material de TiNi el que no presenta inhibición sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. Los resultados presentados en este bioensayo fueron obtenidos por triplicado, graficados como medias, con el programa Microsoft Excel 2013. Comparando los dos ensayos anteriores, los anodizados con y sin carga de gentamicina no permiten el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, pero este ensayo por espectrofotometría solo nos revela una perspectiva del comportamiento del microorganismo ante la presencia de la aleación, ya que este método solo nos permite monitorear el crecimiento bacteriano, no permite determinar si las aleaciones impiden la reproducción del microorganismo o provocan una reducción en la población bacteriana. A continuación, de los datos obtenidos por el método de espectrofotometría, se procedió a determinar el número de células viables por el método de vertido en placa, graficando los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

4.9 Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de vertido en placa

En la figura 4.28, se encuentran graficados los valores de UFC/mL obtenidos por el método de vertido en placa al evaluar las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. Se empleó como control positivo de viabilidad bacteriana, la cepa bacteriana de *S. aureus* y como controles de la aleación se emplearon láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar. En este bioensayo ninguna aleación fue cargada con el antibiótico gentamicina. Los resultados obtenidos para el control positivo muestran un valor promedio de rendimiento celular de 306 UFC/mL, comparado este resultado con los obtenidos en las aleaciones anodizadas nos indica una alta proliferación de la cepa de *S. aureus*, siendo el anodizado de 20V el que presentó mayor actividad antibacteriana, con un valor de 271 UFC/mL, seguido del anodizado a 15 V con un valor de 277 UFC/mL y posteriormente las aleaciones de 5 y 10 V con valores obtenidos de 280 y 289 UFC/mL respectivamente. Estos resultados indican que las aleaciones anodizadas no producen la muerte de las bacterias, si no que impiden su reproducción, por lo que poseen propiedades bacteriostáticas. Mientras que las aleaciones de TiNi y Ti-24Zr-10Nb-2Sn no presentaron inhibición sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, con valores de 301 y 305 UFC/mL respectivamente.

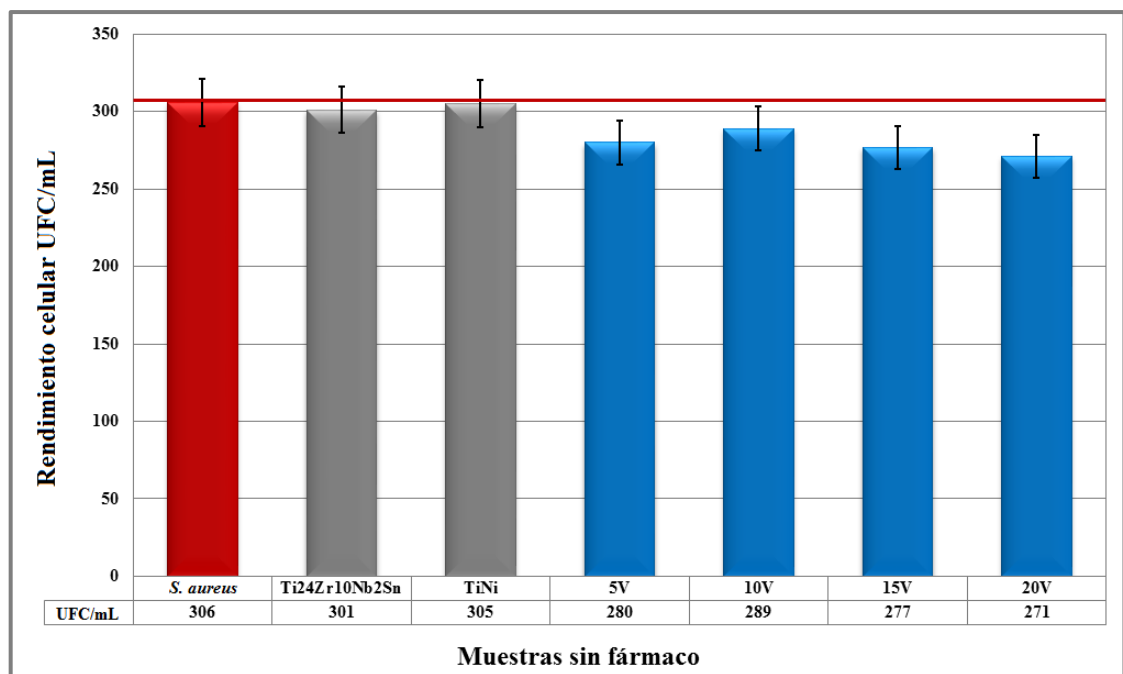


Figura 4.28.- Determinación de la actividad antibacteriana de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de vertido en placa.

En la figura 4.29, se encuentran graficados los valores de UFC/mL obtenidos por el método de vertido en placa al evaluar las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn [5, 10, 15 y 20 Volts] sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*. Se empleó como control positivo de viabilidad bacteriana, la cepa bacteriana de *S. aureus* y como controles de la aleación se emplearon láminas de TiNi y de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar. En este bioensayo cada una de las aleaciones fueron cargadas con el antibiótico gentamicina. Los resultados obtenidos para el control positivo muestran un valor promedio de rendimiento celular de 306 UFC/mL, comparado este resultado con los obtenidos en las aleaciones anodizadas, se observa una sensibilidad de la cepa de *S. aureus* a las cuatro aleaciones anodizadas a las que fue evaluada, siendo el anodizado de 20 V el que presentó mayor actividad antibacteriana, con un valor de 35 UFC/mL, seguido del anodizado a 5 V con un valor de 40 UFC/mL y posteriormente las aleaciones de 15 y 10 V con valores obtenidos de 47 y 49 UFC/mL respectivamente. Estos resultados indican que las aleaciones

anodizadas cargadas con el fármaco gentamicina provocan la muerte de las bacterias por efecto de la liberación del fármaco al medio de cultivo provocando una reducción en la población bacteriana, por lo que estos materiales poseen propiedades bactericidas. Mientras que las aleaciones de TiNi y Ti-24Zr-10Nb-2Sn no presentaron inhibición sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, con valores de 304 y 276 UFC/mL respectivamente.

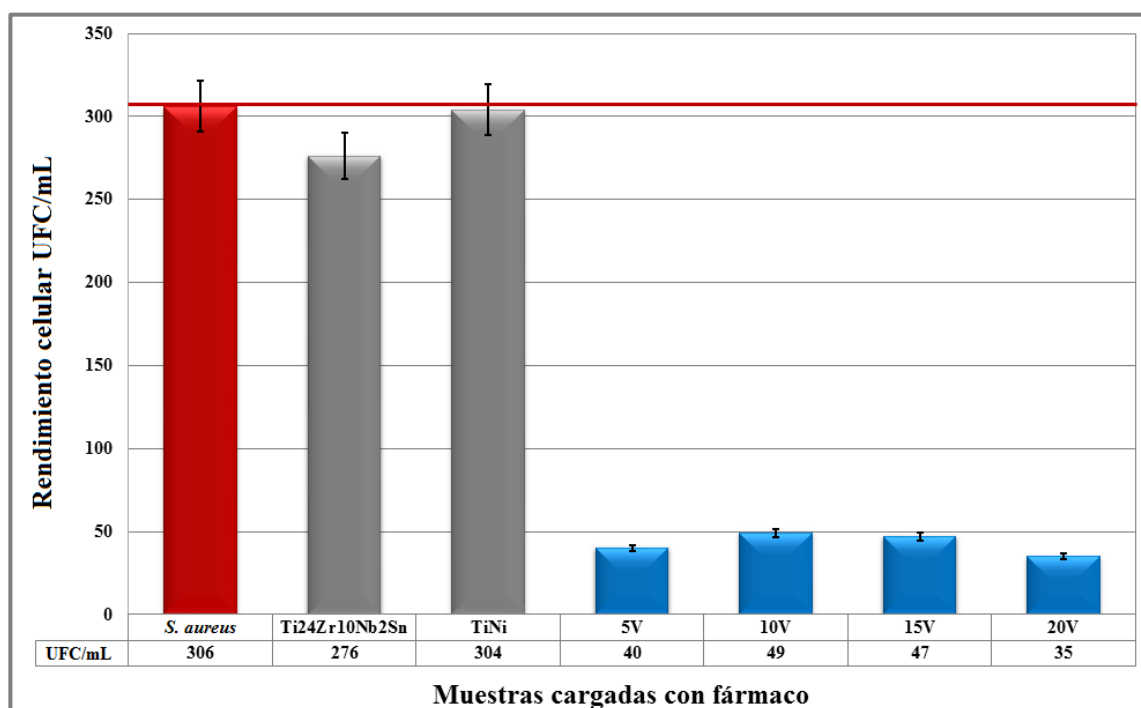


Figura 4.29.- Determinación de la actividad antibacteriana de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre *S. aureus* por el método de vertido en placa.

En base a los resultados aquí expuestos, es visible y necesario evaluar “*in vivo*” el comportamiento de la aleación con nanotubos, por lo que se diseñó una placa mandibular detallada en la sesión 3.2. A continuación se analizarán los resultados obtenidos hasta ahora en este experimento, cabe resaltar que esta evaluación está aún en proceso, sin embargo, consideramos importante presentarlo aquí pues formó parte de la experimentación propuesta al principio de la investigación.

4.10 Estudio “*in vivo*” de la regeneración del tejido óseo mediante la implantación quirúrgica de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn funcionalizada con nanoestructuras de óxido de titanio

La topografía superficial de los implantes dentales es crucial para la adhesión y la diferenciación de los osteoblastos durante la fase inicial de la oseointegración, así como en el remodelado óseo a largo plazo [53, 54]. Aunque se ha propuesto que la microtopografía de la superficie de los implantes dentales actúan a nivel celular de oseointegración [55], se ha reportado que la nanotopografía de los biomateriales influye en las interacciones célula-implante a nivel celular y proteico [56], lo que resulta en una mayor adhesión de las células osteogénicas y, por tanto, se mejora la oseointegración. [57]. En este proyecto de investigación, se desarrollaron pruebas “*in vivo*” que consistió en la implantación quirúrgica de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 10 V, en la mandíbula de ratas, estudiando la evolución y regeneración del tejido óseo por un periodo de 30 días. El anodizado a 10 V, fue elegido en base a los resultados obtenidos en las pruebas de biocompatibilidad “*in vitro*”. Se realizó una cirugía mandibular en un grupo de ratas de experimentación, las cuales se anestesiaron intraperitonealmente con una solución de ketamina (100 mg/mL) y xilacina (100mg/mL), se preparó para la operación aséptica el lado derecho de la mandíbula realizando una incisión de 1 cm mediante un proceso extra oral, el cual se puede observar en la figura 4.30 (a). Se dividió el músculo en dirección de sus fibras para exponer la mandíbula y se utilizó una pieza de mano de alta velocidad con una fresa de acero de 1.5 mm de diámetro para hacer dos surcos de fijación de las mismas dimensiones, este procedimiento se puede observar en la figura 4.30 (b, c), mientras que los surcos obtenidos se puede observar en la figura 4.30 (d). Se practicó una fractura vertical a lo ancho de la mandíbula utilizando un contraángulo dental, (figura 4.31 a), la fractura realizada se señala con una flecha en la figura 4.31 (b). Las superficies de la fractura se pusieron en contacto sin compresión y se colocó la placa de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn

anodizada a 10 V, para su fijación interna (figura 4.31 c) estabilizándola con dos tornillos de 1 mm de largo que restablecieron la alineación anatómica de la mandíbula, el proceso quirúrgico completo se puede observar en la figura 4.31 (d). Tras la operación, se les tomó una radiografía a los animales para mostrar la posición de la placa sobre la mandíbula (figura 4.32 a) y se les administró una solución de ketorolaco inyectable (10 mg/kg/día) para el tratamiento del dolor y gentamicina (1 mg/ kg) para prevenir infecciones post-operatorias.

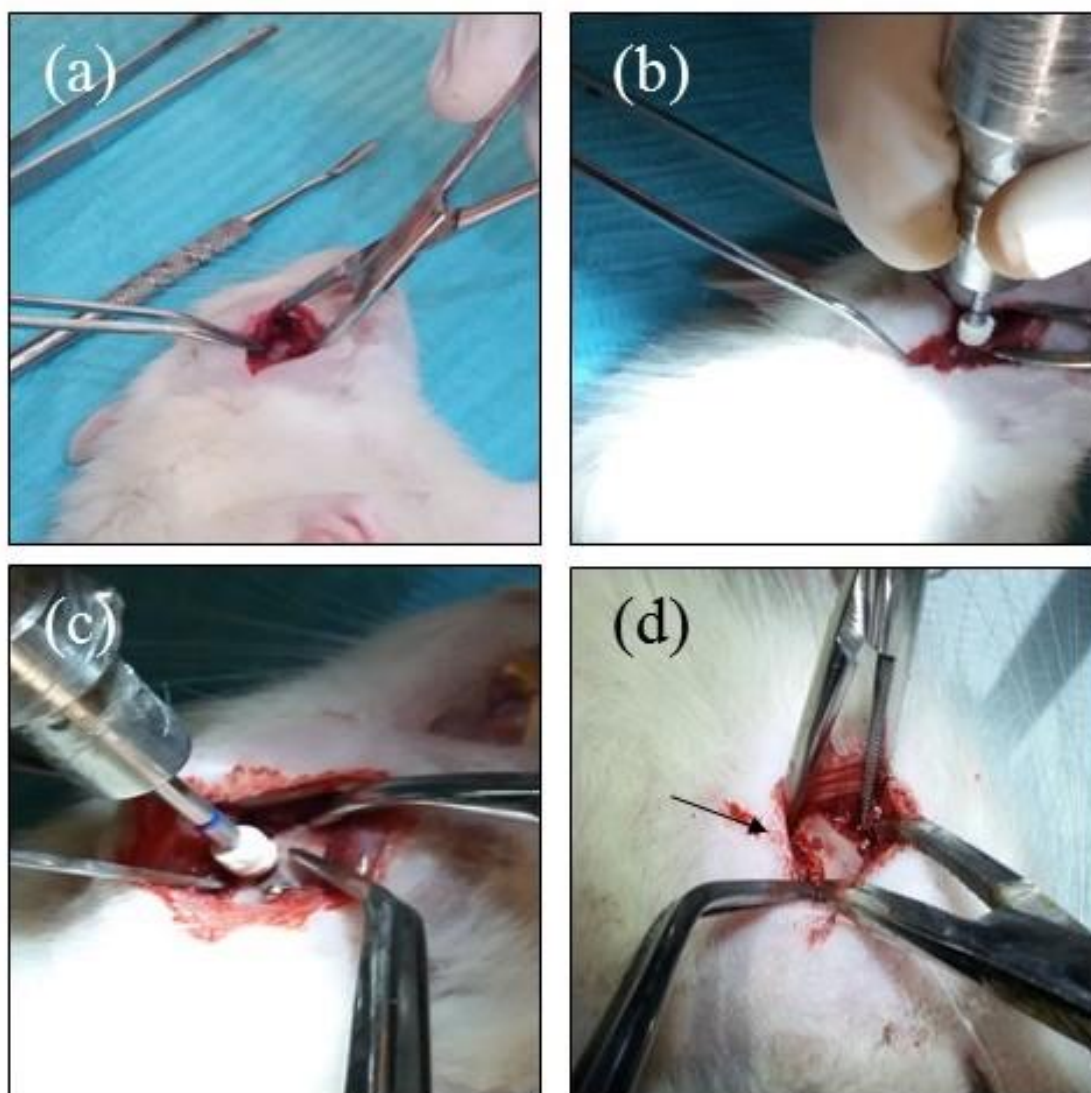


Figura 4.30.- Procedimiento quirúrgico de la fractura mandibular en ratas como modelo de experimentación, (a) incisión extraoral, (b,c) empleo de la pieza de mano de alta velocidad para la obtención de los surcos de fijación, (d) surcos de fijación obtenidos.

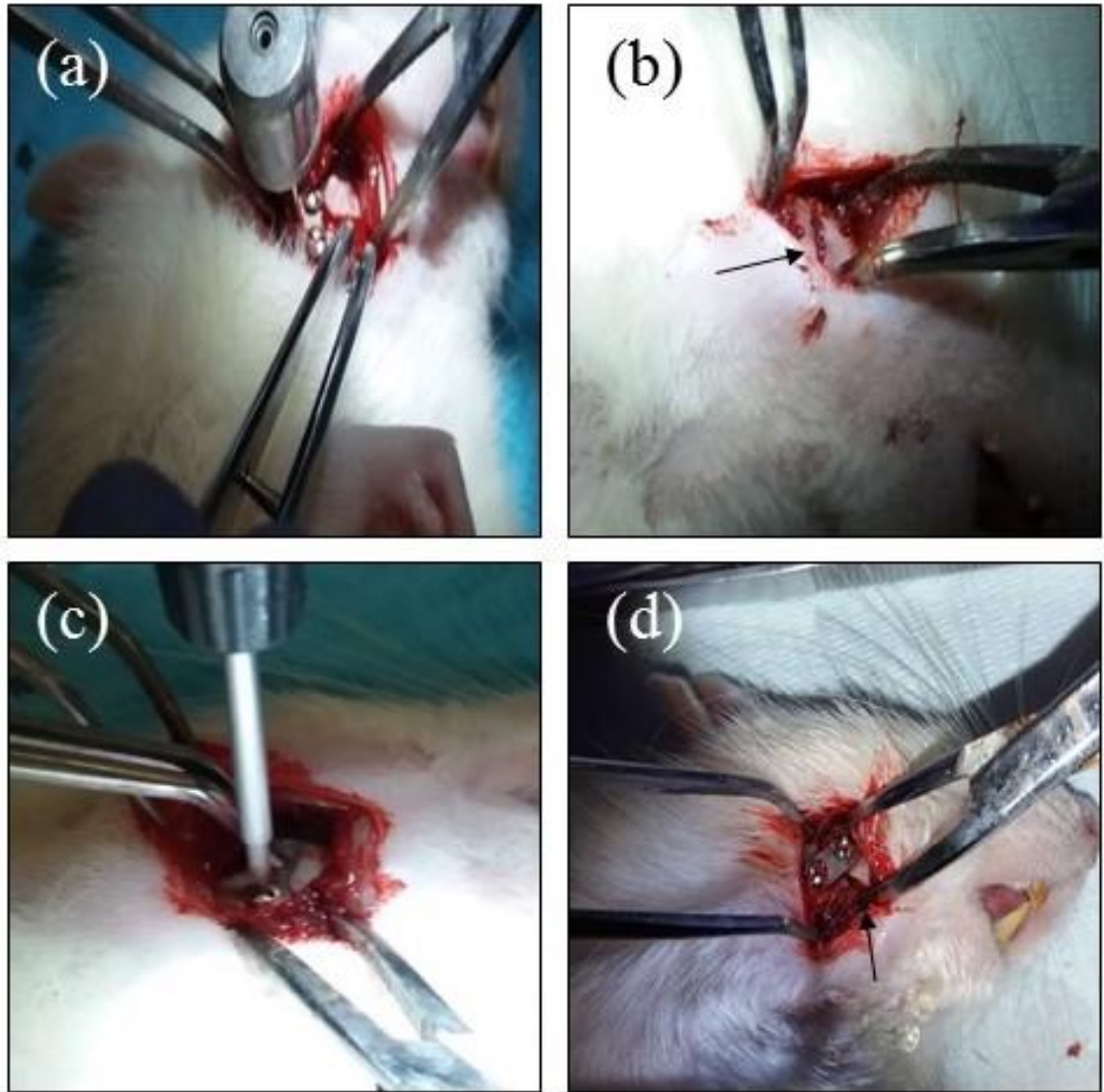


Figura 4.31.- Procedimiento quirúrgico de la fractura mandibular en ratas como modelo de experimentación, (a) empleo de contraángulo para la fractura mandibular (b) fractura mandibular obtenida, (c) fijación de la placa mandibular, (d) vista general del proceso quirúrgico terminado.

Después de un periodo de 30 días, se procedió a examinar el proceso de regeneración ósea, en la mandíbula de una rata. En la figura 4.32 (b, c) se puede observar la formación de hueso nuevo en el área donde se realizó la fractura. Después de la lesión provocada a la mandíbula en el proceso quirúrgico controlado, se ha reportado que el proceso de cicatrización ósea inicia cuando el tejido empieza a proliferar y generar una migración celular hacia la zona afectada,

lo que da lugar a la formación de un hematoma, posteriormente, luego del procedimiento quirúrgico mediante la colocación y fijación de la placa mandibular, comienza la formación de hueso nuevo, con alta actividad fibroblástica, lo que da como resultado múltiples trabéculas óseas que muestran maduración de la matriz orgánica y que se le denomina callo óseo; tras esto se inicia la formación de un tejido fibroso, llamado membrana limitante, para generar hueso cortical, la reparación completa del hueso se logra según lo reportado aproximadamente a las 6 semanas [51, 52]. La valoración clínica post-operatoria y los resultados macroscópicos mostraron que el animal de experimentación, aceptó el procedimiento quirúrgico sin complicaciones, se observó que la placa mandibular fabricada y anodizada a 10 V, presentó una buena adhesión e integración a la superficie del hueso mandibular, sin rechazo ya que el modelo animal evaluado no tuvo problemas en relación a su comportamiento biológico (figura 4.32 d). Se ha reportado que la generación de nanoestructuras sobre la superficie de biomateriales dentales promueve la regeneración de tejido óseo, sin embargo, en este trabajo no fue posible tener un punto de comparación, por lo cual, en futuros proyectos se pretende continuar con esto para conocer y mejorar la biocompatibilidad de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, funcionalizada con nanoestructuras de óxido de Ti.

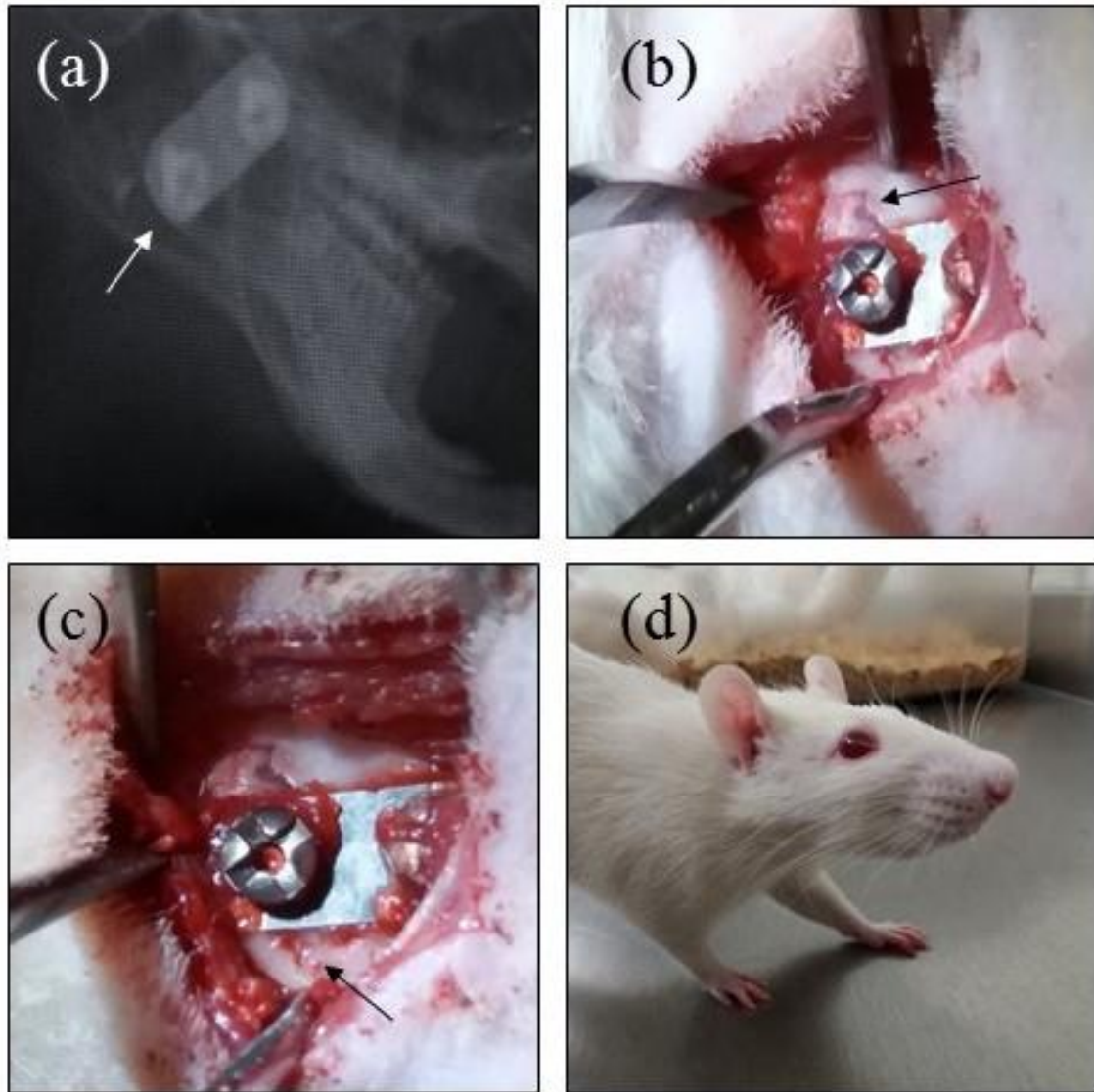


Figura 4.32.- Evaluación del procedimiento quirúrgico y análisis macroscópico de la regeneración del tejido óseo , (a) radiografía que muestra la posición de la placa sobre la mandíbula, (b) imagen que muestra la parte superior de la mandíbula donde se observa la formación de hueso nuevo en el área donde se realizó la fractura, (c) imagen que muestra la parte inferior de la mandíbula donde se observa la formación de hueso nuevo en el área donde se realizó la fractura, (d) modelo animal evaluado, el animal sobrevivió al proceso quirúrgico, conservó la placa y su comportamiento biológico no se vio alterado.

4.11 Referencias

1. P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, *Angewandte Chemie International Edition* 50 (2011) 2904.
2. K. Miura, N. Yamada, S. Hanada, T.K. Jung, E. Itoi, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 2320.
3. N. Masahashi, Y. Mizukoshi, S. Semboshi, N. Ohtsu, T.K. Jung, S. Hanada, *Thin Solid Films* 519 (2010) 276.
4. Ghicov, P. Schmuki, *Chemical Communications* (2009) 2791.
5. Hang, R., Liu, Y., Zhao, L., Gao, A., Bai, L., Huang, X., ... & Chu, P. K. (2014). Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications. *Scientific reports*, 4, 7547.
6. N. Masahashi, Y. Mizukoshi, S. Semboshi, N. Ohtsu, T.K. Jung, S. Hanada, *Thin Solid Films* 519 (2010) 276.
7. Hang, Ruiquiang, Yanlian Liu, Lingzhou Zhao, Ang Gao, Long Bai, Xiaobo Huang, Xiangyu Zhang, Bin Tang & Paul K. Chu. Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications. *Sci. Rep.* 4, 7547; DOI:10.1038/srep07547 (2014).
8. Qiang Liu, Dongyan Ding, and Congqin Ning, "Anodic Fabrication of Ti-Nb-Zr-O Nanotube Arrays," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, Article ID 240346, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/240346.
9. Hiroaki Tsuchiya, Jan M. Macak, Andrei Ghicov, Luciano Taveira, Patrik Schmuki, Self-organized porous TiO₂ and ZrO₂ produced by anodization, *Corrosion Science*, Volume 47, Issue 12, December 2005, Pages 3324-3335, ISSN 0010-938X, <http://doi.org/10.1016/j.corsci.2005.05.041>.
10. Macak JM, Tsuchiya H, Schmuki P. High-aspect-ratio TiO₂ nanotubes by anodization of titanium. *Angew Chem, Int Ed* 2005;44:2100–2.

11. Macak JM, Tsuchiya H, Taveira L, Aldabergerova S, Schmuki P. Smooth anodic TiO₂ nanotubes. *Angew Chem, Int Ed* 2005;44:7473–5.
12. X. J. Feng, J. M. Macak, S. P. Albu, and P. Schmuki, “Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface,” *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 2, pp. 318–323, 2008.
13. Hernández López, J. M. (2015). Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas
14. A. Valota, D.J. LeClere, T. Hashimoto, P. Skeldon, G.E. Thompson, S. Berger, J. Kunze, P. Schmuki, *Nanotechnology* 19 (2008) 355701.
15. R. Olivares, J.J. Olaya, C. Ramírez and S. Rodil, “Biocompatibility of niobium coatings”, *Coatings*, Vol 1, pp. 72-87, 2011.
16. Garzon, A., Aguirre, N., & Olaya, J. (2013). Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos. *Visión Electrónica: algo más que un estado sólido*, 7(1), 160-177.
17. Es.vwr.com. (2017). Placas de cultivo celular multipocillos Falcon® | VWR. [online] Available at: <https://es.vwr.com/store/product/563505/placas-de-cultivo-celular-multipocillos-falcon> [Accessed 3 May 2017].
18. P. Amaravathy, S. Sowndarya, S. Sathyanarayanan, N. Rajendran, Novel sol gel coating of Nb₂O₅ on magnesium alloy for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology*, Volume 244, 15 April 2014, Pages 131-141, ISSN 0257-8972,
19. S. Kunjukunju, A. Roy, M. Ramanathan, B. Lee, J.E. Candiello, P.N. Kumta, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8690–8703.
20. S.A. Catledge, Y.K. Vohra, S.L. Bellis, A.A. Sawyer, J. Nanosci. Nanotechnol. 4 (2004) 986–989.

21. Michiardi, A. (2006). Nuevo tratamiento de oxidación en aleaciones de NiTi para aplicaciones biomédicas. Caracterización superficial y respuesta biológica in vitro. Universitat Politècnica de Catalunya.
22. D. Clavijo, "Crecimiento y caracterización de un recubrimiento nanoestructurado para uso biomédico", Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2010.
23. Gómez, J. E., Gómez, L. E. F., Rivero, P. E., & Valdivieso, W. (2007). Estudio de citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma en ti6al4v superficialmente modificado. *Scientia et technica*, 1(36)
24. El Medawar L, Rocher P, Hornez JC, Traisnel M, Breme J, Hildebrand HF. Electrochemical and cytocompatibility assessment of NiTiNOL memory shape alloy for orthodontic use. *Biomol Eng* 2002; 19:153–60.
25. Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the material side. *Trends Biotechnol* 2007;26(1). doi:10.1016/j.tibtech.2007.10.005
26. Puckett S, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 2010;31(4):706–13.
27. Taylor E, Webster TJ. The use of superparamagnetic nanoparticles for biofilm prevention. *Int J Nanomed* 2009;4:145–52.
28. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. Control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 2007;6:997–1003.
29. Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, Voros J, Spencer ND. Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials* 2007;28:5000–6

30. Papat KC, Eltgroth M, LaTempa TJ, Grimes CA, Desai TA (2007) Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants, *Small* 11:1878–1881
31. Gulati, K., Aw, M. S., & Losic, D. (2011) Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 571. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-6-571>
32. Losic D, Simovic S: Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv* 2009, 6:1363-1380.
33. T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, A nanostructured titania bioceramic implantable device capable of drug delivery to the temporal lobe of the brain, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 300, Issues 1–2, 1 June 2007, Pages 3-10, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.060>.
34. Gulati, K., Kant, K., Findlay, D., & Losic, D. (2015). Periodically tailored titania nanotubes for enhanced drug loading and releasing performances. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(12), 2553-2559.
35. Gulati, K., Aw, M. S., & Losic, D. (2012). Nanoengineered drug-releasing Ti wires as an alternative for local delivery of chemotherapeutics in the brain. *International journal of nanomedicine*, 7, 2069.
36. Çalışkan, N., Bayram, C., Erdal, E., Karahaliloğlu, Z., & Denkbaş, E. B. (2014). Titania nanotubes with adjustable dimensions for drug reservoir sites and enhanced cell adhesion. *Materials Science and Engineering: C*, 35, 100-105.
37. Moseke, C., Hage, F., Vorndran, E., & Gbureck, U. (2012). TiO₂ nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents. *Applied Surface Science*, 258(14), 5399-5404.

38. Zhang, Y., He, F., Sun, Z., Li, L., & Huang, Y. (2014). Controlled delivery of dexamethasone from TiO₂ film with nanoporous structure on Ti–25Nb–3Mo–2Sn–3Zr biomedical alloy without polymeric carrier. *Materials Letters*, 128, 384-387.
39. C.A.d.D.J. Arenas M.A., Matikyna E, Esteban J, Gomez-Barrena E, Perez-Jorge C, Perez Tanoira R, *Materiales de titanio anodizado con fluor*, PATENT, PCT/ES2011/070342. Spain. (2010).
40. C.P.-J. Peremarch, R.P. Tanoira, M.A. Arenas, E. Matykina, A. Conde, J.J.D. Damborenea, E.G. Barrena and J. Esteban, Bacterial adherence to anodized titanium alloy, *Journal of Physics: Conference Series*, 252 (2010) 012011.
41. C. Pérez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gómez-Barrena and J. Esteban, In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti–6Al–4V alloy, *J Biomed Mater Res Part A*, 100A (2012) 1696-1705.
42. Forbes, B., Bailey, W., Scott, E., Sahm, D., Weissfeld, A. and Trevino, E. (2009). *Bailey & Scott diagnóstico microbiológico*. 1st ed. Buenos Aires: Panamericana.
43. M. Yoshinari, Y. Oda, T. Kato, K. Okuda, *Biomaterials* 22 (2001) 2043
44. Prats, G. and Ausina Ruiz, V. (1993). *Microbiología médica*. 1st ed. Barcelona: Doyma.
45. Craig A. Grimes and Gopal K. Mor, *TiO₂ Nanotube Arrays: Synthesis, Properties, and Applications*, Springer Science & Business Media, 2009, pages 285-309, ISBN1441900683, 9781441900685.
46. D.R. Buddy, S.H. Allan, J.S. Frederick, E.L. Jack, *Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, 2004.

47. H.J. Busscher, H.C. van der Mei, G. Subbiahdoss, P.C. Jutte, J.J.A.M. van den Dungen, S.A.J. Zaat, M.J. Schultz, D.W. Grainger, Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface, *ScienceTranslational Medicine*, 4 (2012) 153rv110.
48. M. Yoshinari, Y. Oda, T. Kato, K. Okuda, *Biomaterials* 22 (2001) 2043.
49. C. Pérez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gómez Barrena and J. Esteban, In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti–6Al–4V alloy, *J Biomed Mater Res Part A*, 100A (2012) 1696-1705.
50. Iqb.es. (2017). GENTAMICINA EN VADEMECUM. [online] Available at: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/g004.htm> [Accessed 16 Abril 2017].
51. Damante JH, Da S Guerra EN, Ferreira Jr O. Spontaneous resolution of simple bone cysts. *Dentomaxillofac Radiol*. 2002 May; 31(3): 182-6.
52. Zhao Y, Liu B, Han QB, Wang SP, Wang YN. Changes in bone density and cyst volume after marsupialization of mandibular odontogenic keratocysts (keratocystic odontogenic tumors). *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 May; 69(5) 1361-6. Epub 2010 dec 31.
53. R. Junker, A. Dimakis, M. Thoneick, and J. A. Jansen, “Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 20, supplement 4, pp. 185–206, 2009.
54. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq, “Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration,” *Dental Materials*, vol. 23, no. 7, pp. 844–854, 2007.

55. F. Rupp, L. Scheideler, D. Rehbein, D. Axmann, and J. Geis Gerstorfer, "Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications," *Biomaterials*, vol. 25, no. 7-8, pp. 1429–1438, 2004.
56. G. Mendonça, D. B. S. Mendonça, F. J. L. Aragão, and L. F. Cooper, "Advancing dental implant surface technology from micron- to nanotopography," *Biomaterials*, vol. 29, no. 28, pp. 3822–3835, 2008.
57. T. J. Webster and J. U. Ejirofor, "Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo," *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4731–4739, 2004.

5. CONCLUSIONES

Se logró funcionalizar la superficie de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn con estructuras nanotubulares, mediante la técnica de anodización empleando una solución electrolítica de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y NH_4F a voltajes constantes de 5, 10, 15 y 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Mediante las técnicas de caracterización SEM-EDAX fue posible caracterizar la morfología y dimensiones de las estructuras nanotubulares. El análisis realizado mostró que el diámetro y la longitud media de los nanotubos aumentaron casi linealmente mediante la variación del voltaje aplicado, mientras que la caracterización de la composición elemental reveló la incorporación de los elementos O y F en las muestras anodizadas.

Las estructuras nanotubulares de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn demostraron tener una buena biocompatibilidad "*in vitro*". El estudio realizado por microscopía de fluorescencia, indicó que las células de cultivo primario tienen la capacidad de adherirse a las aleaciones anodizadas. La evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas mediante el ensayo colorimétrico de MTT, mostró que la aleación anodizada a 5 V fue la que presentó la mayor viabilidad celular con un porcentaje de 99%, en comparación con los anodizados de 10, 15 y 20 V en donde se observa una disminución en la viabilidad celular a medida que se modifica la superficie, estas variaciones se atribuyen a las diferencias de carácter físico-químico, tales como la composición química o diferencias en la estructura del óxido.

Las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn tienen la capacidad de carga-liberación del fármaco gentamicina, se observó que el anodizado de 20 V presentó un alto contenido de carga de fármaco por lo que el proceso de liberación fue más lento en comparación con el anodizado de 5 V que con un contenido de carga de fármaco más bajo, el proceso de liberación fue rápido, lo cual está relacionado

con características morfológicas y las dimensiones obtenidas por influencia de los parámetros del anodizado, específicamente en el voltaje aplicado.

Las pruebas antibacterianas realizadas en este estudio mostraron que las aleaciones anodizadas presentan un efecto bacteriostático sobre el crecimiento “*in vitro*” de *S. aureus*, mientras que las aleaciones anodizadas y cargadas con el fármaco gentamicina presentan un efecto bactericida sobre el crecimiento “*in vitro*” de este microorganismo. El efecto bacteriostático se atribuye a la incorporación de los iones flúor por efecto del proceso de anodización, en cambio el efecto bactericida se atribuye a la liberación del fármaco gentamicina cargado en las aleaciones anodizadas al medio de cultivo bacteriano.

Se logró fabricar un implante con propiedades de memoria de forma y superelasticidad, funcionalizando la superficie de este material con nanotubos fabricado a 10 V. Los resultados obtenidos de las pruebas de biocompatibilidad “*in vivo*” fueron satisfactorios pues el modelo animal de experimentación, no tuvo complicaciones post-operatorias ni problemas en su comportamiento biológico durante el tiempo de evaluación, la observación macroscópica de la interacción hueso-placa mostró una buena adhesión e integración de la placa a la superficie del hueso mandibular, apreciando la formación de hueso nuevo en la zona donde se llevó acabo la intervención quirúrgica, después de un periodo de 30 días.